

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**Departamento de Nutrición y Bromatología II
(Bromatología)**



TESIS DOCTORAL

Compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rebeca López Froilán

Directores

**María Luisa Pérez Rodríguez
Montaña Cámara Hurtado**

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II

**COMPUESTOS BIOACTIVOS EN BEBIDAS
CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

REBECA LÓPEZ FROILÁN

Bajo la dirección de las doctoras:

María Luisa Pérez Rodríguez

Montaña Cámara Hurtado

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Nutrición y Bromatología II



TESIS DOCTORAL

**COMPUESTOS BIOACTIVOS EN BEBIDAS
CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

REBECA LÓPEZ FROILÁN

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II
Bromatología

M^a DOLORES TENORIO SANZ, PROFESORA TITULAR DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE FARMACIA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA QUE:

El presente trabajo de investigación titulado **“Compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante”** se ha realizado en este Departamento bajo la dirección de las doctoras María Luisa Pérez Rodríguez y Montaña Cámara Hurtado y constituye la Memoria que presenta la licenciada Dña. Rebeca López Froilán para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a quince de octubre de dos mil quince.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II
Bromatología

**MARÍA LUISA PÉREZ RODRÍGUEZ Y MONTAÑA CÁMARA HURTADO,
PROFESORAS TITULARES DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA,
EN EL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II:
BROMATOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE FARMACIA, DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID,**

CERTIFICAN QUE:

Dña. Rebeca López Froilán, ha realizado bajo su dirección y en este Departamento el trabajo que lleva por título **“Compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante”** y que constituye su Memoria de Tesis Doctoral. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a quince de octubre de dos mil quince.

AGRADECIMIENTOS

Hay a tantas personas a las que dar las gracias que no sé por dónde empezar, porque lo más probable es que se me olvide alguien.

En primer lugar quería agradecer a mis directoras las doctoras María Luisa Pérez Rodríguez y Montaña Cámara Hurtado, por su inestimable ayuda tanto en el desarrollo de la parte experimental de la tesis, como por sus aportaciones científicas en el presente trabajo. Y gracias por apoyarme durante estos años.

Mis más sinceros agradecimientos a la directora del departamento Dolores Tenorio Sanz y a la anterior directora del departamento Carmen Díez Marqués cuando entré en este departamento, por su apoyo durante estos años.

No quiero olvidarme de las ya doctoras Esther y Natalia en la colaboración que realizamos juntas, agradecerle también a la doctora M^o Cortes Sánchez-Mata su apoyo en esta colaboración, tanto técnica como el conocimiento científico aportado.

También quería darles las gracias a la doctora Virginia Fernández Ruiz, tanto por sus consejos y como por su gran disposición a ayudar.

A los demás profesores del departamento Mercedes, Araceli, José, María José, María Aurora, Amparo, Mayte, Inma, Mari Cruz y Esperanza, por su amabilidad y apoyo durante estos años.

Bueno también quería darles las gracias a todos mis compañeros durante estos años, muchos de ellos ya doctores, Patricia García, Lula, Brigi, Carolina, Silvia, Laura, y Víctor, por los buenos ratos que hemos pasado durante estos años, y a Patricia Morales por ayudarme cuando necesité sus consejos.

Además tampoco quiero olvidarme del personal de departamento durante estos años, Rosi, Fernando y Javier, gracias por vuestra ayuda.

Dar las gracias a la doctora Blanca Hernández-Ledesma por invitarme a realizar el ORAC en su laboratorio del CIAL, y aportarme una nueva visión y también a los doctores Silvana Silveira, Daniel Martínez y Marta Garcés por su ayuda técnica durante el desarrollo experimental de esta técnica.

Agradecerle a mi familia que me ha aguantado durante estos años, tanto alegrías como frustraciones, y sobre todo por sus puntos de vista distintos a los míos a la hora de enfocar el presente trabajo.

A mi familia

RESUMEN/ABSTRACT	1
-------------------------	---

INTRODUCCIÓN

1.	IMPORTANCIA DE LAS BEBIDAS	13
2.	PROBLEMÁTICA DE LA OXIDACIÓN	23
3.	REVISIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	41
3.1.	Mecanismos de transferencia de átomo de hidrógeno	45
3.1.1.	Inhibición de la oxidación de sustratos lipídicos	46
3.1.2.	Inhibición de la acción del radical peroxilo	48
3.1.3.	Inhibición frente a la acción de otras especies reactivas	52
3.2.	Mecanismos de transferencia electrónica	55
3.2.1.	Neutralización de radicales artificiales	56
3.2.2.	Capacidad reductora frente a iones metálicos	59
3.3.	Neutralizadores de otras especies reactivas	63
3.3.1.	Técnicas de Resonancia de Espín Electrónico	64
3.3.2.	Otros Métodos	65

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

4.	OBJETIVOS	69
5.	PLAN DE TRABAJO	71

METODOLOGÍA

6.	MÉTODOS ANALÍTICOS	77
6.1.	Parámetros fisicoquímicos	77
6.1.1.	pH	77
6.1.2.	°Brix	77
6.1.3.	Acidez titulable:	77
6.2.	Vitamina C	77
6.3.	Ácidos orgánicos	79
6.4.	Polifenoles totales	79
6.4.1.	Fast Blue BB	79

6.5.	Familias fenólicas	80
6.5.1.	Ácidos hidroxibenzoicos	80
6.5.2.	Ácidos hidroxicinámicos-flavonoles	80
6.5.3.	Antocianinas monoméricas totales	80
6.5.4.	Análisis del color polimérico de las antocianinas	81
6.6.	Capacidad antioxidante	82
6.6.1.	ORAC	82
6.6.2.	TEAC	83
6.6.3.	Sustancias reductoras totales (Folin)	84
6.6.4.	CUPRAC	85
6.6.5.	FRAP	85
6.6.6.	O-fenantrolina (o-fen)	86
6.6.7.	Índice de potencial antioxidante	87
6.7.	Bioaccesibilidad de compuestos bioactivos	87
7.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	89
7.1.	Análisis de la varianza	89
7.2.	Correlación de Pearson	89
7.3.	Análisis de componentes principales	90

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.	CAFÉ	93
8.1.	Objetivos específicos	102
8.2.	Muestreo	102
8.3.	Determinaciones analíticas	104
8.4.	Resultados y discusión	106
8.4.1.	Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en el café soluble	106
8.4.2.	Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en los dializados de café soluble	121
8.4.3.	Evaluación de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos	127
8.5.	Conclusiones Parciales	131

9.	ZUMOS	133
9.1.	Objetivos específicos	146
9.2.	Muestreo	146
9.3.	Determinaciones Analíticas	150
9.4.	Resultados y Discusión	152
9.4.1.	Selección de las muestras	152
9.4.2.	Parámetros fisicoquímicos	159
9.4.3.	Vitamina C	164
9.4.4.	Ácidos orgánicos	166
9.4.5.	Polifenoles totales y familias	175
9.4.6.	Capacidad antioxidante	183
9.4.7.	Valoración del etiquetado	200
9.5.	Conclusiones Parciales	213
CONCLUSIONES		
10.	CONCLUSIONES	219
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	225
11.1.	Bibliografía científica	225
11.2.	Normativa	253
ANEXO		
PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO		257

Resumen / Abstract

RESUMEN

Título:

"Compuestos bioactivos en bebidas con capacidad antioxidante"

Introducción:

El consumo de bebidas no alcohólicas en España está constituido principalmente, además del agua mineral, y las bebidas refrescantes, por los zumos y las bebidas estimulantes con predominio del café.

Estas bebidas, especialmente los zumos de frutas y el café, son una importante fuente de compuestos bioactivos. Concretamente el café es la mayor fuente de polifenoles en la dieta española, mientras que los zumos de frutas, junto con las frutas cítricas, constituyeron el 43 % de ingesta de vitamina C de los niños españoles.

En ambos tipos de bebidas, los ácidos orgánicos, además de aportar propiedades organolépticas, como la acidez al café (ácido acético), se comportan como queladores metálicos e incluso se considera al ácido quínico como un inductor antioxidante.

Por estos motivos se consideró de interés abordar los siguientes objetivos y plan de trabajo.

Objetivos y plan de trabajo:

- Evaluación de los compuestos bioactivos presentes en las bebidas no alcohólicas seleccionadas: Cafés y zumos de frutas.
- Selección y puesta en marcha de los métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*, teniendo en cuenta la adecuación de los ensayos realizados a las muestras bajo estudio, bebidas no alcohólicas.
- Evaluar la capacidad antioxidante de bebidas no alcohólicas (café y zumos).
- Estudiar la bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos bioactivos del café soluble para determinar su potencial efecto antioxidante sobre el organismo, tras la ingestión de la bebida.
- Comparar las bebidas que presentan alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en su etiquetado con aquellas que no lo hacen.

Entre las bebidas comercializadas actualmente en España con posible capacidad antioxidante se eligieron dos tipos en concreto, bebidas estimulantes, escogiendo distintos tipos de café soluble y bebidas a base de frutas, entre las que se seleccionaron diferentes zumos y néctares. Un criterio para la elección de estas últimas fue la inclusión o no de alegaciones nutricionales o de propiedades saludables en el etiquetado de las mismas con el objeto de poder comparar ambos tipos de muestras y realizar un análisis de dicho etiquetado.

Asimismo se realizó una selección adecuada tanto de los métodos de evaluación de los compuestos bioactivos (compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y vitamina C), como de los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante.

Los once cafés solubles analizados se dividieron en tres grupos: regulares, descafeinados y mezclas (una formada por mezcla de café verde y café tostado y otra de achicoria y café tostado).

Se realizó la caracterización del café mediante la evaluación del contenido en polifenoles totales, con el nuevo método Fast Blue BB adaptado a un espectrofotómetro convencional, la determinación de las familias polifenólicas, del contenido en ácidos orgánicos y la evaluación de la capacidad antioxidante mediante 5 métodos distintos: TEAC, CUPRAC, Folin, FRAP y o-fenantrolina, seguidos posteriormente de un análisis de bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos y del potencial antioxidante, que consistió en la evaluación de las muestras de café soluble una vez digeridas *in vitro* y dializadas.

Tras realizar un estudio de mercado se seleccionaron 20 muestras entre zumos, néctares y bebidas refrescantes a base de fruta. A partir de su capacidad antioxidante y de su contenido en vitamina C se realizó una selección más exhaustiva de las muestras, quedando 3 zumos y 3 néctares, todos ellos de sabores mixtos, en los que, además de los parámetros fisicoquímicos (pH, acidez titulable, y °Brix), se evaluó su contenido en compuestos bioactivos (vitamina C, ácidos orgánicos, polifenoles totales, familias polifenólicas) así como su capacidad antioxidante mediante 5 métodos distintos, previamente acondicionados a este tipo de muestras: ORAC, TEAC, CUPRAC, Folin y FRAP. Para este estudio se emplearon 3 lotes distintos de cada uno los zumos y néctares finalmente seleccionados.

Resultados y conclusiones

El Fast Blue BB resulta un método eficaz, sencillo y económico, como método de estimación de polifenoles totales, y presenta una buena correlación con los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante empleados. Así la correlación con el método CUPRAC fue de 0,742 en el café y de 0,936 $p < 0,01$ en los zumos, donde también presentó una buena correlación con el método ORAC (0,912 $p < 0,01$).

En los distintos tipos de café soluble el ácido acético, el ácido piroglutámico y el ácido quínico se encontraron en cantidades muy elevadas. Además se identificaron en todos ellos el ácido cítrico y el ácido fumárico. En la mezcla de achicoria-café soluble se identificó también el ácido succínico, que resultó ser el ácido orgánico mayoritario en esta muestra.

La mezcla de café tostado con un 35 % de café verde enriquece la bebida preparada con ella en polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, respecto al resto de cafés analizados. Sin embargo, la mezcla con un 60 % de achicoria implica una disminución de todos los compuestos bioactivos y de la capacidad antioxidante con respecto a los cafés solubles convencionales.

Concretamente, tanto la capacidad antioxidante como el contenido de polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles se diferenciaron significativamente del resto de cafés solubles evaluados, con valores reducidos aproximadamente a la mitad.

Una vez realizada la digestión *in vitro* y diálisis posterior, los valores determinados tanto en ácidos hidroxicinámicos y flavonoles como en la capacidad antioxidante, disminuyeron significativamente, mientras que algunos ácidos orgánicos como el ácido acético y el ácido quínico en algunos cafés solubles incluso aumentaron su concentración. Este incremento podría atribuirse principalmente a la digestión de otros ácidos. Así el ácido cítrico participaría en el aumento del acético y la digestión de los ácidos hidroxicinámicos conjugados conllevaría un incremento en la concentración del ácido quínico.

Destaca principalmente la alta bioaccesibilidad de los ácidos orgánicos comparada con la obtenida para las familias polifenólicas y la capacidad antioxidante. Mientras que la bioaccesibilidad de las familias polifenólicas no llegó al 25 %, todos los ácidos orgánicos presentaron valores de bioaccesibilidad superiores al 40 %. A excepción del ácido fumárico, en la mezcla con achicoria, con un 23 % de bioaccesibilidad, en este ensayo se obtuvieron valores superiores al 100 % para el ácido quínico en dos cafés regulares y en dos cafés descafeinados, y para el ácido acético en un café descafeinado y en la mezcla achicoria-café.

El ensayo de bioaccesibilidad proporciona información de cómo el café soluble podría influir en la capacidad antioxidante *in vivo*. Si se comparan las muestras estudiadas la que mayor bioaccesibilidad presentó en referencia a su capacidad antioxidante, fue la mezcla de café verde y tostado con valores entre el 24 y el 36 % dependiendo del método evaluado.

Con los resultados obtenidos en la primera selección de bebidas a base de fruta se encontró que la capacidad antioxidante, evaluada mediante el método de Folin, se incrementaba en este tipo de muestras según lo hacía su contenido en zumo. El contenido en vitamina C mostró valores superiores al 15 % de la CDR en la mayoría de las muestras, excepto en las bebidas refrescantes a base de zumo.

Entre los 3 zumos y 3 néctares seleccionados posteriormente, el mayor contenido en vitamina C correspondió a un néctar cuyo componente principal era la naranja.

Los ácidos orgánicos mayoritarios en las muestras analizadas fueron el ácido cítrico y el málico, a excepción de un zumo compuesto por zumo de uva, frutas rojas y acerola en el que el ácido quínico ocupó el primer lugar.

El contenido de polifenoles totales, estimado por el método Fast Blue BB, es dos veces mayor en los zumos compuestos mayoritariamente por frutos rojos que en los néctares elaborados con estos mismos frutos, y prácticamente cuadriplica el contenido en el néctar de naranja y en el zumo de naranja y mango

Los ácidos hidroxibenzoicos fueron la familia polifenólica mayoritaria en los seis productos analizados. El zumo y el néctar con zumo de naranja en su composición, mostraron mayor contenido de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, en cambio en ninguno de los dos se detectaron antocianinas. El mayor contenido en antocianinas lo mostró el zumo compuesto por uva, granada y grosella negra. Además se evaluó el porcentaje de color polimérico de estas seis muestras, con un valor superior al 30 % en todas ellas, lo que indica algún tipo de tratamiento térmico, como podría ser un proceso de conservación.

Para poder diferenciar, entre las distintas muestras, aquellas que presentaban la mayor capacidad antioxidante en los cinco métodos de evaluación empleados, se utilizó el índice de potencial antioxidante (IPA) compuesto, que permitió destacar como el zumo de mayor capacidad antioxidante al de acerola y frutas rojas, aunque sin diferencias con el zumo de uva, granada y grosella negra.

En resumen, hay que destacar la contribución de ambas bebidas a la ingesta de polifenoles. Así, 200 ml de café soluble y de zumo de frutos rojos, aportan alrededor de 300 y 600 mg de ácido gálico, respectivamente. Además estos zumos comerciales contribuyen a la ingesta de vitamina C con un 30% de la CDR por vaso..

Además de estas determinaciones analíticas, se realizó la evaluación del etiquetado de las 20 bebidas a base de zumo inicialmente seleccionadas, pudiendo diferenciarse 3 grupos: sin declaraciones, con declaraciones nutricionales, y con alegaciones de propiedades saludables, en este último a su vez se puede distinguir dos grupos el primero en el que la alegan las propiedades saludables como "fuente de antioxidantes" o bien mostrando una declaración de propiedades saludables propiamente dicha. Al comparar los diferentes grupos de productos entre sí, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras que presentaban alegaciones y las que no lo hacían.

ABSTRACT

Thesis title:

"Bioactive Compounds in beverages with antioxidant capacity"

Introduction:

The consumption of non-alcoholic beverages in Spain is formed primarily, in addition to the mineral water and soft drinks, juices and the stimulant drinks with predominance of the coffee.

These beverages, especially fruit juices and coffee, are an important source of bioactive compounds. Specifically coffee is a major source of polyphenols in the Spanish diet, while fruit juices, along with citrus fruits, accounted for 43 % of vitamin C intake of Spanish children in 2003.

In such beverages, organic acids, besides providing organoleptic properties, such as coffee acidity (acetic acid) act as metal chelators and even to quinic acid is considered as an antioxidant inductor.

For these reasons, it was considered of interest to tackle the following objectives and work plan.

Objectives and work plan

- Assessment of the bioactive compounds present in soft drinks selected in this study: coffee and fruit juices.
- Selection and implementation of methods for the evaluation of in vitro antioxidant capacity, considering the adequacy of tests performed on the samples under study, nonalcoholic beverages.
- To evaluate the antioxidant capacity of soft drinks (coffee and fruit juices).
- Study the bioaccessibility in vitro of the bioactive compounds of the soluble coffee to determine its potential antioxidant effect on the body, after the ingestion of the drink.
- Compare the beverages that proclaim their antioxidant properties in labeling, with those that do not do it.

Among the beverages nowadays commercialized in Spain with possible antioxidant capacity two types in particular, stimulants, choosing different types of soluble coffee, and fruit-based drinks, including juices and nectars, were chosen. A criterion for the choice of the latter was the inclusion or not of nutritional or health claims on their labels in order to be able to compare both types of samples and conduct an analysis of such labeling. Proper selection of both evaluation methods of bioactive compounds (phenolic compounds, organic acids and vitamin C), and the methods for evaluating the antioxidant capacity was also performed.

The eleven instant coffees analyzed were divided into three groups; regulars, decaffeinated and blends (one formed by mixture of green and roasted coffee and other by chicory and roasted coffee). Coffee characterization was realized through the evaluation of total polyphenols content, using a new method, Fast Blue BB after its adaptation to a conventional spectrophotometer, determining polyphenolic families, the organic acids content and the evaluation of the antioxidant capacity using 5 different methods: TEAC, CUPRAC, Folin, FRAP and o-phenanthroline, followed subsequently by an analysis of bioaccessibility of bioactive compounds and potential antioxidant, which consisted in the assessment of the soluble coffee samples after *in vitro* digestion and dialysis.

After conducting a market study 20 samples from juices, nectars and fruit-based soft drinks were selected. From its antioxidant capacity and its vitamin C a more comprehensive selection of the samples was performed, leaving three juices and nectars, all mixed flavors, in which, besides the physicochemical parameters (pH, titratable acidity and °Brix), the content of bioactive compounds (vitamin C, organic acids, polyphenols, polyphenol families) and their antioxidant capacity by five different methods were evaluated: ORAC, TEAC, CUPRAC, Folin and FRAP. For this study, three different batches of each finally selected juices and nectars were used.

Results and conclusions

Fast blue BB resulted as a simple, effective and economic method to estimate the total polyphenols content, also it showed a good correlation with the antioxidant capacity method CUPRAC, in coffee, 0.742 and in fruit juices 0.936 $p < 0.01$, where also presented a good correlation with ORAC (0.912 $p < 0.01$).

Elevated quantities of acetic acid, pyroglutamic acid and quinic acid were found in the instant coffees studied. Citric acid and fumaric acid were also identified in all samples. However succinic acid was only present in the chicory-roasted coffee blend and it was the main acid.

The mixture of roasted coffee with 35 % green coffee brew enriched in its polyphenols, hydroxycinnamic acids and flavonols, compared to other coffees analyzed. However, the mixture with 60 % chicory implies a reduction of all bioactive compounds and antioxidant capacity compared to conventional soluble coffees.

After the *in vitro* digestion and subsequent dialysis, the values of hydroxycinnamic acids, flavonols and antioxidant capacity, decreased significantly, while some organic acids such as acetic acid and quinic acid in some instant coffees even increased concentration. This increase can mainly be attributed to the digestion of other acids. Citric acid would participate in increasing acetic and digestion of the conjugates hydroxycinnamic acids would lead to an increase in the concentration of quinic acid.

Mainly highlights the high bioaccessibility of organic acids compared to that obtained for families and polyphenolic antioxidant capacity. While the bioaccessibility of the polyphenol families not reached 25 %, all organic acids showed bioaccessibility values above 40 %. An exception of fumaric acid in the mixture with chicory, with a 23 % bioaccessibility, values above 100 % were obtained in this assay for the quinic acid in two regular coffees and two decaffeinated coffees, and for the acetic acid in a decaffeinated coffee and in the chicory-coffee mixture.

The bioaccessibility assay provides information on how the soluble coffee could influence the antioxidant capacity *in vivo*. If we look for the samples, which presented greater bioaccessibility referring to its antioxidant capacity, we will find that it was the mixture of green and roasted coffee with values between 24 and 36 % depending on the method evaluated.

The results obtained for the first selection of the fruit-based beverages, show that their antioxidant capacity evaluated by Folin method increased as it did the fruit content in juices.

The vitamin C content showed values higher than the 15 % Recommended Daily Allowances (RDA) in the majority of samples, except in juice-based soft drinks. Among subsequently selected juices and nectars (3 samples of each), the higher content of vitamin C corresponded to nectar whose main component was orange.

The major organic acids in samples tested were citric acid and malic acid, except for a juice composed of grape juice, red fruits and acerola in which quinic acid ranked first.

The total polyphenol content, estimated by the method Fast Blue BB, is two times greater in the juices composed mainly of red fruits than nectars made with these same fruits, and virtually quadruples the content in the nectar of orange and the orange juice and mango.

The hydroxybenzoic acids were the major polyphenolic family in all samples. The fruit juice and the nectar composed mainly by orange juice, showed the highest content in hydroxycinnamic acids and flavonols, but the anthocyanins were not detected.

The highest value of anthocyanins content corresponded to a fruit juice composed by grape, pomegranate and blackcurrant juices. Also, it was evaluated the polymeric color percent. As all values obtained were higher than 30 %, it could be inferred some kind of degradation in the samples, like a conservation process.

In order to differentiate between the different samples, those that had the highest antioxidant capacity in the five assessment methods used, the index of antioxidant potential (IPA) compound was calculated. It allowed emphasizing the acerola and red fruits as the juice with the highest antioxidant capacity, without significant differences with grape juice, pomegranate and blackcurrant.

In summary, highlight the contribution of both beverages to the intake of polyphenols. Well, the soluble coffee, consumed regularly in the homes, provides about 300 mg of gallic acid (cup of 200 ml), and a glass (200ml) of juice of red fruits provides 600 mg of gallic acid. In addition these juices commercial contributors to the dietary intake of vitamin C with 30% of the RDA per glass of juice.

Besides these laboratory tests, evaluation of labeling of 20 fruit-based drinks initially selected is made and can be differentiated 3 groups: without claims, with nutritional claims and health claims, the latter in turn can distinguish two groups, the first in which the health claims were included like "source of antioxidants" and the second showing health claims at the labeling. When comparing the different product groups together, no significant differences between the samples presenting claims and the ones without them were found.

Introducción

1. IMPORTANCIA DE LAS BEBIDAS

La sociedad moderna se enfrenta a un problema mundial, las enfermedades crónicas, tales como las enfermedades cardio y cerebrovasculares, la diabetes y el cáncer (Costa et al. 2012). En concreto, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014), el 68 % de las defunciones registradas, se debieron a este tipo de enfermedades y más del 40 % de ellas (16 millones) fueron muertes prematuras ocurridas antes de los 70 años de edad.

Una de las teorías más aceptada es que el estrés oxidativo está involucrado en la etiología de varias enfermedades crónicas (Mayne, 2003; Knasmüller et al. 2008), incluidas las anteriormente mencionadas. Esta implicación supone que los antioxidantes, tanto endógenos como exógenos, son necesarios para proteger a los componentes celulares del daño oxidativo (Prior y Wu, 2013). De ahí se deduce que una dieta rica en antioxidantes puede disminuir la incidencia de ciertas patologías (López-Alarcón y Denicola, 2013).

Para reducir el riesgo de cardiopatía coronaria, accidente cerebrovascular e hipertensión la OMS, (2003) recomendó el consumo diario de frutas y verduras frescas (incluidas bayas, hortalizas de hoja verde, crucíferas y leguminosas) en cantidades adecuadas (400-500 g diarios).

Antes y después de estas recomendaciones dadas por la OMS, se han estudiado ampliamente las dietas donde el consumo de frutas y verduras era elevado, suscitando un gran interés la Dieta Mediterránea, ya que, principalmente, tiene una alta ingesta en frutas y verduras, en comparación con otras dietas occidentales, además de la ingesta de aceite de oliva y vino, con moderación (Martínez-González y Estruch, 2004).

En un principio, el papel protector de las frutas y verduras frente a la enfermedad se atribuyó de forma exclusiva a su valor nutricional, caracterizado por poseer escaso valor energético y gran cantidad de vitaminas (principalmente vitamina C, ácido fólico y provitamina A), minerales (potasio y magnesio, con un bajo contenido en sodio) y fibra (soluble e insoluble), lo que hace a los vegetales alimentos esenciales dentro de una alimentación sana y equilibrada (Navia Lombán y Perea-Sánchez, 2007).

Sin embargo, según Crozier et al. (2010), los efectos beneficiosos de las dietas ricas en frutas, vegetales y bebidas, no sólo son debidas a sus nutrientes, también se deben a la diversidad de metabolitos secundarios de las plantas, distintos compuestos fitoquímicos y particularmente a los compuestos fenólicos.

De los diferentes estudios realizados sobre distintos fitoquímicos, ya sea en estudios de cohorte, u observacionales, se desprende que la probabilidad de que los fitoquímicos tengan actividad antioxidante u otras actividades como la anticancerígena, está relacionada con los efectos sinérgicos entre los mismos. Así, parece ser que los efectos protectores son mayores en dietas ricas en estos compuestos que mediante la suplementación de los mismos (Martínez-González y Estruch, 2004; Liu, 2003).

En estudios epidemiológicos como el proyecto MONICA, del que se derivó la Paradoja Francesa (Renaud et al. 1992), y el *Zutphen Elderly Study* (Hertog et al. 1993), se concluye que la ingesta de polifenoles y flavonoides proporcionados por distintos alimentos disminuyen el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Estudios posteriores como PREDIMED, basado en la dieta Mediterránea (Zamora-Ros et al. 2013), y EPIC (Boffetta et al. 2010) han corroborado las hipótesis de que una dieta rica en frutas y vegetales disminuye el riesgo de padecer cierto tipo de enfermedades.

Quizás la teoría antioxidante sea la más estudiada en relación a la prevención de estas enfermedades a través de la dieta, fundamentalmente la dieta basada en el consumo de frutas y verduras. Y, sin ninguna duda en este aspecto, son los polifenoles, metabolitos secundarios de las plantas, los compuestos bioactivos más investigados en estas últimas dos décadas.

Debido a la dificultad de medir por separado cada componente antioxidante y a las interacciones entre componentes antioxidantes diferentes, se desarrollaron distintos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante total (Prior y Cao, 2000).

En las últimas dos décadas, se han desarrollado una gran cantidad de estudios, tanto de la valoración de la capacidad antioxidante, como de los compuestos bioactivos responsables de la misma, en distintos tipos de frutas y vegetales como manzana (Boyer y Liu, 2004), arándanos y otras bayas (Zheng et al. 2003), ciruela (Donovan et al. 1998), kiwi (Du et al. 2009), vegetales silvestres (Morales et al. 2012) y setas (Barros et al. 2008).

Además de las frutas y hortalizas, las mayores fuentes de antioxidantes son las bebidas, como el vino tinto, el café, el té y los zumos de frutas (Scalbert y Williamson, 2000). Se ha estudiado ampliamente su contenido en fitoquímicos, principalmente polifenoles, y se ha medido la capacidad antioxidante del café (Vignoli et al. 2001; Gómez-Ruiz et al. 2007) de varios tipos de té (Rababah et al. 2004; Alarcón et al. 2008), de zumos de frutas comerciales, como naranja (Sánchez-Moreno et al. 2003), granada (Borges et al. 2010; Gil et al. 2000), arándano amargo (Chen et al. 2001) y de zumo de tomate (Sánchez-Moreno et al. 2006), entre otros. Además, Saura-Calixto y Goñi (2006), en su estudio sobre la evaluación de la capacidad antioxidante de la dieta española, incluyeron las bebidas como parte de la dieta completa.

La encuesta ENIDE correspondiente al año 2010 demuestra que la ingesta de fruta y verdura en una gran parte de la población española se encuentra por debajo de los niveles recomendados, una media de 3,5 raciones/día (2 fruta + 1,5 verduras) (AESAN, 2011). Por ello, se ha considerado que las bebidas serían una buena alternativa para incrementar el consumo de los compuestos bioactivos aportados por estos alimentos vegetales, ya que sus características permiten eliminar las barreras sensoriales del consumo de éstos proporcionando una forma adecuada de ingestión de fitoquímicos (Mullen et al. 2010; Wootton-Beard y Ryan, 2011).

Las bebidas son un componente importante de la dieta diaria, categorizadas en dos grandes grupos: no alcohólicas y alcohólicas (Butt y Sultan, 2011), la clasificación de las bebidas se encuentra detallada esquemáticamente en la figura 1.1.

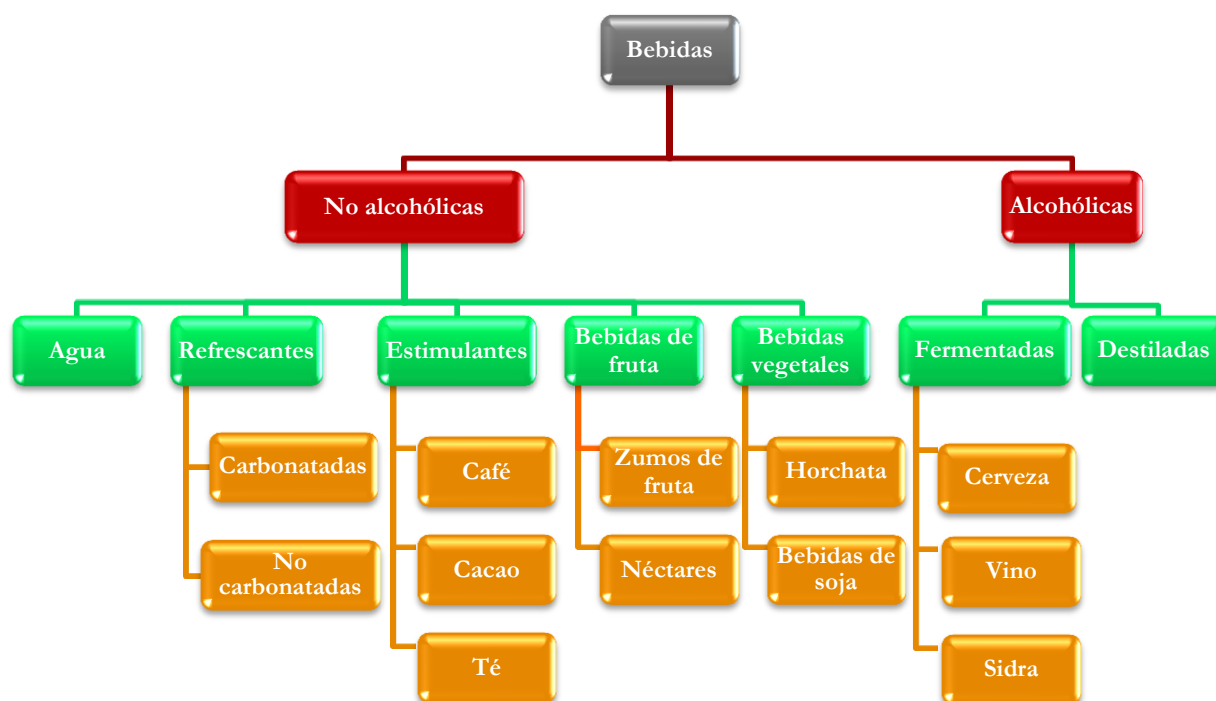


Figura 1.1: Clasificación de las bebidas

Bebidas no alcohólicas

Dentro de las bebidas no alcohólicas, se encuentra el agua, la cual es esencial para la vida. Aunque los humanos pueden sobrevivir sin alimentos un número de semanas, sin fluidos no más de unos pocos días. Es necesaria para mantener la integridad de los tejidos y proporcionar las condiciones óptimas para los procesos bioquímicos que ocurren en nuestras células, ya que el agua actúa en un gran número de funciones esenciales (Duthie y Crozier, 2003; Benelam y Wyness, 2010).

La consideración del agua como nutriente esencial, al mismo nivel que los demás nutrientes, en los tratados de nutrición y guías alimentarias es relativamente reciente (González-Gross, 2013), de hecho, en la primera guía alimentaria española en la que se incluye su ingesta diaria recomendada de agua fue en el año 2001 (Guillén Sans, 2001), en la cual recomendaba 6 raciones de agua al día para adultos (6 vasos de 250 ml) y 8 o más vasos de agua para los ancianos.

Parte de las necesidades de agua están cubiertas por la ingesta de alimentos, pero su fuente principal en la dieta son las bebidas. En la mayoría de las poblaciones, las bebidas representan entre el 70 y 80 % de la ingesta total de agua. Una amplia disponibilidad de bebidas aumenta la probabilidad de alcanzar las ingestas adecuadas de agua (EAIs) fijadas en Europa por la EFSA (2,5 l/día para hombres y 2 l/día para mujeres) para población sana bajo condiciones moderadas de temperatura y actividad (*European Institute Hydration*, EIH, 2014).

El consumo de bebidas en España, según la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE), realizada por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) queda reflejado en el gráfico 1.1. Como se puede observar en el mismo, la principal bebida ingerida es el agua, alrededor de 1 litro/persona/día, consumo similar al de Estados Unidos situado entre los 835-1248 ml/día (Popkin, 2010). A esta ingesta contribuye con un 61 % el agua de la red, 37 % el agua mineral y con el 2 % el agua con gas.

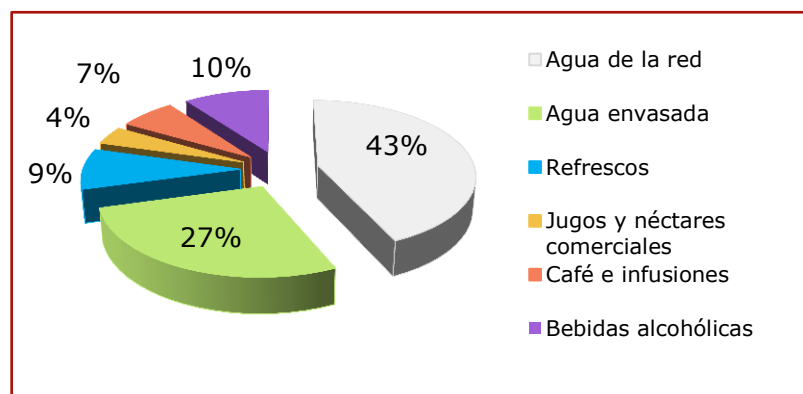


Gráfico 1.1: Distribución del consumo de bebidas en España (AESAN, 2011)

Es importante conocer también la ingesta de otras bebidas no alcohólicas, ya que éstas contribuyen a la ingesta calórica diaria en un 2%, siendo su principal fuente energética los hidratos de carbono en forma de azúcares simples (AESAN, 2011).

Además de la encuesta ENIDE realizada por la AESAN, desde el año 2000 se realiza por el Ministerio de Agricultura y Medioambiente (MAGRAMA) otra encuesta sobre los hábitos de compra en el hogar (panel de consumo en el hogar), donde se reflejan claramente las tendencias de la población española en relación al consumo de bebidas.

En el gráfico 1.2, se puede observar los datos obtenidos *per cápita* entre los años 2004 al 2013, en el consumo de bebidas no alcohólicas en el hogar.

En estos 10 años estudiados, el hecho que más destaca es la variación producida en el consumo de agua mineral, en el cual se puede observar que entre los años 2004 al 2008 se produjo un crecimiento del 18 %, situándose el consumo en el año 2008 en 57,54 l/persona/año, seguido de un fuerte decrecimiento del 10 % entre los años 2009 al 2012, finalmente en el 2013 se observa un ligero crecimiento del consumo de agua mineral.

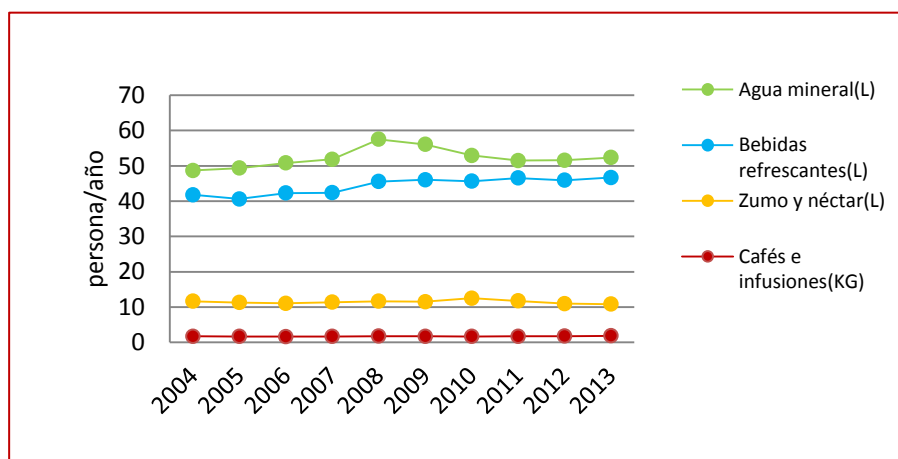


Gráfico 1.2: Evolución del consumo de bebidas, per cápita, en el hogar 2004-2013 (MAGRAMA, 2014)

La explicación al crecimiento en el consumo de agua mineral entre los años 2004 al 2008 pudo deberse al concepto de hidratación conveniente, además de las campañas realizadas por las empresas embotelladoras sobre la promoción de sus beneficios para la salud así como a la mayor frecuencia de alimentación fuera del hogar (Roethenbaugh, 2005; Martínez et al. 2007).

En el gráfico 1.2 el decrecimiento en el año 2008 no sólo se observa en el consumo de agua mineral sino que también observa en el resto de las categorías, con un repunte de crecimiento en el consumo de bebidas no alcohólicas en el hogar en al año 2013, menor del 2 %.

Según este panel de consumo sobre los hábitos de compra en relación a las bebidas no alcohólicas, las bebidas que presentaron una mayor estabilidad durante la última década son las bebidas estimulantes, con una variación interanual media del 3 %.

Como se puede observar en el gráfico 1.3, el consumo *per cápita* de las bebidas no alcohólicas, a excepción del café e infusiones, ha disminuido significativamente entre los años 2008 al 2012.

El consumo de café en estos años evaluados ha variado entre 1,7 kg persona/año y 1,83 kg persona/año en el año 2013, aunque su consumo experimentó un descenso del 3,5 % en el año 2010 (gráfico 1.3), su variación media en los 10 años estudiados se situó en el 3 %.

Sólo los zumos y los néctares experimentaron un incremento del 8,5 % entre 2009 y 2010, debido principalmente al incremento en el consumo de zumos refrigerados, néctares sin azúcar y zumos enriquecidos. Los zumos refrigerados, zumos enriquecidos y néctares sin azúcar han seguido creciendo hasta el año 2011 pero en conjunto el consumo de zumos y néctares descendió entre los años 2010 al 2013.

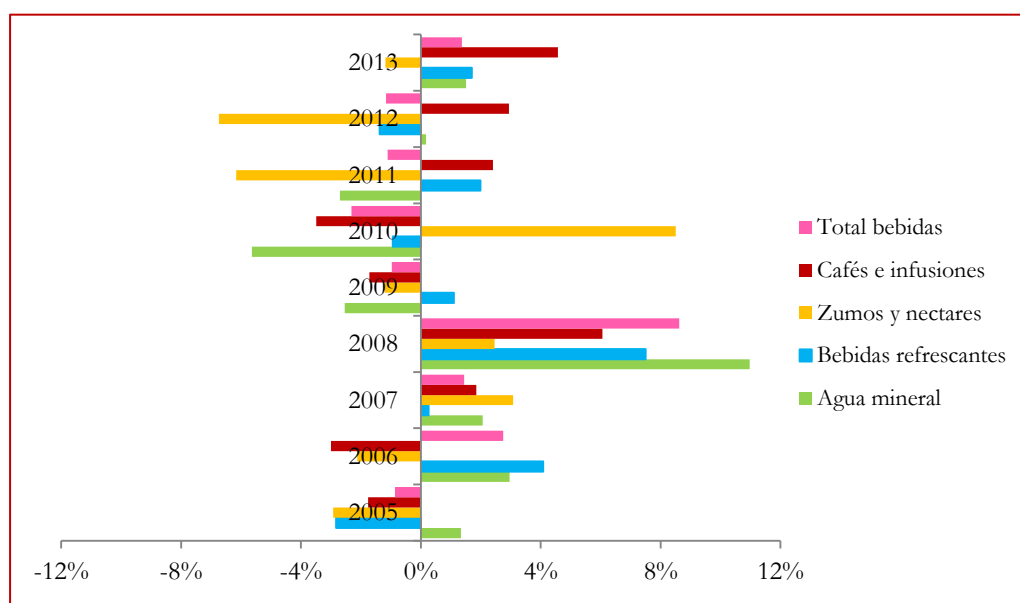


Gráfico 1.3: Variación interanual del consumo de bebidas analcohólicas 2004-2013
(MAGRAMA, 2014)

En el mercado español se han introducido una serie de bebidas en esta última década. Una de las categorías que ha experimentado una mayor expansión han sido las bebidas refrescantes, especialmente aquellas que no contienen azúcar en su composición y también aquellas que no contienen gas.

Una categoría nueva introducida en España han sido las aguas saborizadas, cuyo gran auge se situó entre los años 2008 y 2009, con la llegada de no sólo aguas con sabor afrutado, sino de aguas con extractos de hierbas o té, además de aguas funcionales.

Aunque han aparecido en el mercado nuevos tipos de bebidas refrescantes desde el año 2008 como las bebidas de zumo leche, con un crecimiento mayor al 65 % hasta el año 2013 y bebidas refrescantes como las isotónicas que su consumo experimentó un crecimiento cercano al 200 % entre los años 2004 y 2013, aún están lejos de los 22 l/persona/año de los refrescos de cola.

Los patrones de consumo en Europa, y especialmente en España, en bebidas refrescantes, que según la encuesta ENIDE (2011), se encuentran en una ingesta media de 124,86 ml/día, son distintos a los de Estados Unidos, con una ingesta media que varía de los 307 a 520 ml/día (Gibson et al. 2012). Aquí los refrescos sólo representan el 1 % del aporte energético diario (ANFABRA, 2010), mientras que en otros países, como México, representa alrededor del 20 % del aporte a la ingesta calórica diaria (Rivera et al. 2008).

El consumo de bebidas refrescantes en los hogares españoles se distribuye por tipo y sabor de la bebida refrescante, según el gráfico 1.4:

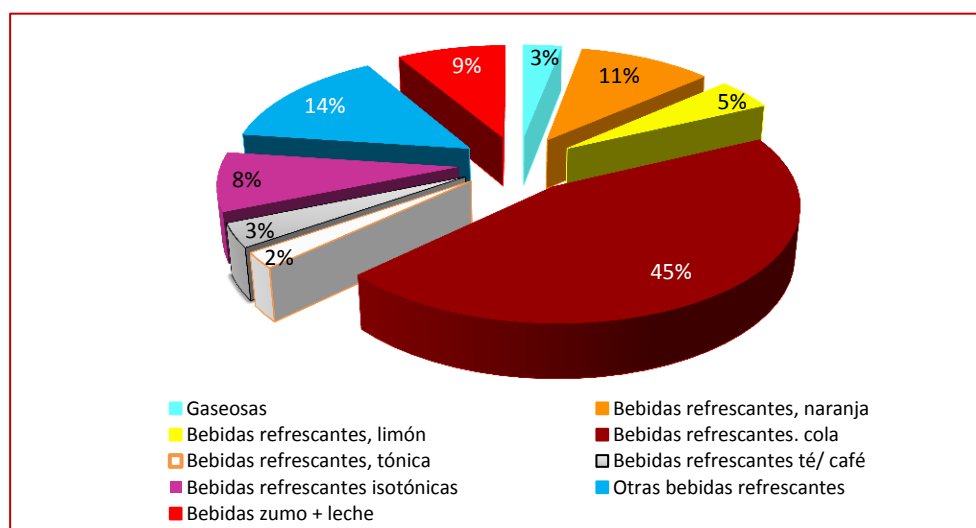


Gráfico 1.4: Consumo de bebidas refrescantes por sabor en España en el año 2013 (MAGRAMA, 2014)

Otro aspecto que cabe destacar en esta década es la aparición de bebidas denominadas comercialmente como "funcionales", como son las mezclas de café (verde y tostado), además de otras procedentes de otros países, o los zumos de frutas exóticas, como por ejemplo el zumo de bayas goji.

Dentro de la gran variedad de bebidas existentes en nuestros mercados, en este estudio hemos seleccionado algunas correspondientes a dos categorías distintas, bebidas estimulantes (café) y bebidas a base de fruta (zumos).

2. PROBLEMÁTICA DE LA OXIDACIÓN

El desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes a favor de estos últimos es lo que se conoce como estrés oxidativo (Sies, 1997). Para Gülçin, (2012) el estrés oxidativo representa un desequilibrio entre la producción y manifestación de las especies reactivas y la habilidad del sistema biológico para detoxificar fácilmente los intermedios reactivos o reparar el resultado del daño. Este desequilibrio puede ser debido a que la concentración de antioxidantes está reducida (Somogyi et al. 2007), o causado por perturbaciones en la producción de las especies reactivas de oxígeno, desde fuentes endógenas o por factores ambientales (Brenneisen et al. 2005).

Un radical libre es una especie química que posee uno o más electrones desapareados. La presencia de radicales libres y moléculas no radicalarias derivadas de los radicales libres en altas concentraciones es peligrosa en los organismos vivos, ya que tiene la habilidad de dañar a los orgánulos celulares (Somogyi et al. 2007).

El término especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*; ROS) es un término colectivo que incluye al radical hidroxilo, anión superóxido, pero también a otros derivados del oxígeno no radicales como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso. También se emplea un término similar para las especies reactivas de nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*; RNS) (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Las especies reactivas endógenas se producen en la mitocondria durante los procesos de respiración siendo mayor la producción al envejecer las células (Knasmüller et al. 2008). Además participan en la transducción y transcripción de los genes (Fang et al. 2002) y son producidas en el organismo como parte de la primera defensa inmune. Los fagocitos se defienden de organismos exteriores por la síntesis de grandes cantidades de $O_2^{\bullet-}$ y NO^{\bullet} como parte de su mecanismo (Diplock et al. 1998).

Las fuentes exógenas de radicales libres son el tabaco, el alcohol, el estrés, los contaminantes, los quimioterapéuticos, la exposición a los rayos UV y la radiación ionizante (Romero et al. 2013). También es importante tener en cuenta que una de las mayores fuentes exógenas es la nutrición ya que algunos alimentos pueden estar oxidados o contener pro-oxidantes como peróxidos, aldehídos o metales de transición (Knasmüller et al. 2008).

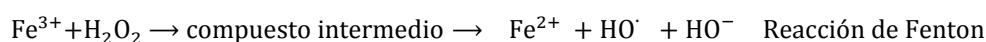
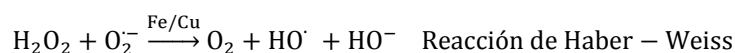
Tabla 2.1: Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Radicales libres		No radicales	
Superóxido	$O_2^{\bullet -}$	Ozono	O_3
Hidroxilo	HO^{\bullet}	Oxígeno singlete	O_2^1
Peroxilo	RO_2^{\bullet}	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Alcoxilo	RO^{\bullet}	Trióxido de dinitrógeno	N_2O_3
Hidroperoxilo	HO_2^{\bullet}	Ácido peroxinitrico	$ONOOH$
Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\bullet}	Óxido nitroso	N_2O
Óxido nítrico	NO^{\bullet}	Peroxinitrito	$ONOO^-$
Radical tiol	RS^{\bullet}	Ácido nitroso	HNO_2
Triclorometilo	CCl_3^{\bullet}	Ácido hipocloroso	$HClO$

El **anión superóxido** ($O_2^{\bullet -}$) es un radical libre iniciador formado por el transporte electrónico mitocondrial. Juega un papel importante en la formación del peróxido de hidrógeno y el oxígeno singlete en sistemas vivos (Lee et al. 2004). Hay especies más selectivas que otras, así el anión superóxido $O_2^{\bullet -}$ inactiva la enzima ácido dihidroxi-dehidratasa de *Escherichia coli* y el peróxido de hidrógeno H_2O_2 inactiva la fructosa-bisfosfatasa en el cloroplasto de la espinaca, mientras que el HO^{\bullet} puede reaccionar con cualquiera de los dos enzimas (Halliwell, 1987).

El **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2) es generado *in vivo* en condiciones fisiológicas ya sea por reacciones enzimáticas o por la dismutación del anión superóxido (Magalhaes et al. 2008). El H_2O_2 puede generar el radical hidroxilo en presencia de iones metálicos y de anión superóxido, como en una reacción tipo Harber-Weiss. También puede producir oxígeno singlete por reacción con el anión superóxido, con $HClO$ o cloraminas en los sistemas vivos. Además de producir otros radicales libres el peróxido de hidrógeno, puede degradar ciertas proteínas hemo, como la hemoglobina, debido a la liberación de los iones hierro (Karadag et al. 2009).

El **radical hidroxilo** (HO^\bullet) es el más reactivo con una vida media de 10^{-9} s. Se genera *in vivo* con radiación de alta intensidad por escisión homolítica del agua del cuerpo o desde el peróxido de hidrógeno catalizada por metales como en reacciones tipo Fenton o Harber–Weiss (Diplock et al. 1998).



Reacción 2.1: Producción de radicales hidroxilo, adaptado de Gille y Sigler, (1995)

Un aspecto importante de la defensa antioxidante *in vivo* es minimizar la disponibilidad de los iones de metales de transición que catalizan reacciones de este tipo y otras reacciones de radicales libres (Halliwell, 2012).

El **oxígeno singlete** (O_2^1) corresponde a un estado excitado del oxígeno que se produce de forma natural en los cloroplastos y la retina de los mamíferos por acción de la luz (Halliwell y Gutteridge, 1984).

El **óxido nítrico** (NO^\bullet) se origina a partir de la L-arginina por la NO sintasa. En sí mismo no es muy reactivo, pero una sobreproducción está involucrada en la reperusión isquémica y enfermedades neurodegenerativas e inflamaciones crónicas, como la artritis reumatoide (Lee et al. 2004). Puede reaccionar con el anión superóxido para formar peroxinitrito, que es capaz de inducir la peroxidación lipídica, pero además puede interrumpir la señal celular por la nitración de los residuos de tirosina en proteínas (Diplock et al. 1998; Halliwell 2006).

El **ácido hipocloroso** (HClO) es un oxidante muy fuerte que es generado a partir del peróxido de hidrógeno y cloruro, por la enzima mieloperoxidasa, particularmente en los fagocitos inmunológicamente activados (Fang et al. 2002). Ataca principalmente a aminas y grupos sulfhídrido ($-\text{SH}$) en proteínas y pueden clorar las bases púricas del ADN (Auroma, 1997).

El **radical peroxilo** (ROO^{\bullet}) tiene una vida relativamente larga, segundos, con una considerable trayectoria de difusión en sistemas biológicos. Puede ser generado en un proceso de peroxidación lipídica por la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado (PUFA) (Diplock et al. 1998).

En general, si no se regula la producción de especies reactivas apropiadamente, estas son capaces de generar un daño celular a lípidos, proteínas, o ADN, inhibiendo de este modo etapas de transducción de la señal y el comportamiento normal celular (Brenneisen, et al. 2005).

Entre las moléculas más vulnerables al daño oxidativo se encuentran las membranas lipídicas, las enzimas proteolíticas, y el ADN (Kohen y Nyska, 2002).

El daño a las membranas lipídicas, las cuales son fácilmente oxidables debido a la presencia de ácidos grasos insaturados, se conoce como peroxidación lipídica. En los alimentos la peroxidación lipídica es la responsable del enranciamiento de las grasas durante el almacenamiento y esta oxidación provoca en el alimento olores desagradables que disminuyen la calidad del mismo (Xu, 2012).

La peroxidación lipídica sucede en tres etapas (Halliwell y Chirico, 1993; Gutteridge, 1995), todas ellas representadas en la figura 2.1:

1. **Iniciación:** La especie reactiva ataca al lípido abstrayéndole un átomo de hidrógeno, éste se estabiliza por un reordenamiento molecular. Una vez formado el dieno conjugado puede reaccionar con el oxígeno presente formando un radical peroxilo.
2. **Propagación:** consiste en que el radical peroxilo formado durante la iniciación ataque a un ácido graso próximo y se inicie otra reacción.
3. **Terminación:** la reacción transcurre hasta que el radical peroxilo reaccione con un antioxidante de ruptura de cadena, como por ejemplo α -tocoferol.

El resultado neto de la peroxidación lipídica es la conversión de ácidos grasos insaturados en hidroperóxidos lipídicos polares, que pueden alterar en gran medida las propiedades fisicoquímicas de las bicapas lipídicas de la membrana, lo que como resultado produciría una disfunción celular grave (Catalá, 2009; Avery, 2011).

La peroxidación lipídica es importante tenerla en cuenta *in vivo* ya que contribuye a la formación y desarrollo de la aterosclerosis y posiblemente de la diabetes (Halliwell, 2002).

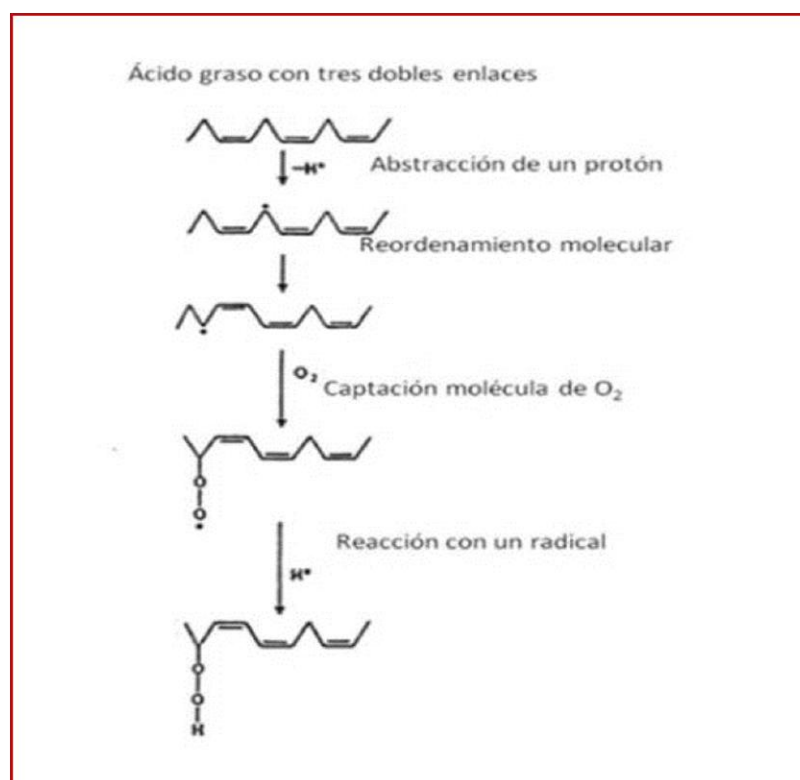


Figura 2.1: Peroxidación lipídica, adaptado de Gutteridge (1995)

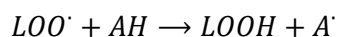
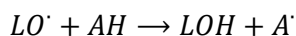
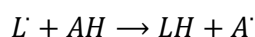
El daño oxidativo a las proteínas es causado por diferentes vías. Los datos actuales establecen que hay unas proteínas más sensibles que otras, ya sea por la presencia de residuos amino, por el sitio de enlace al metal o por su localización a nivel celular. La oxidación de las proteínas puede llegar a formar agregados citotóxicos, además de abrir rutas que lleven a la apoptosis celular (Avery, 2011).

La mayor parte del daño al ADN es atribuible al radical hidroxilo que puede interactuar con el fosfato del azúcar o con la cadena de las bases nitrogenadas. También puede provocar daño el NO^{\bullet} actuando indirectamente con la formación de peroxinitrito, que puede unirse covalentemente a las bases nitrogenadas. Aunque la vía más dañina es indirectamente debida a los ataques de los productos procedentes de la peroxidación lipídica (Knasmüller et al. 2008).

Los compuestos químicos capaces de generar una potencial toxicidad oxigénica se denominan pro-oxidantes (Somogyi et al. 2007).

Un antioxidante se puede definir como la sustancia que en muy baja concentración en comparación con el sustrato, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación del mismo (Halliwell, 1995). Algunos antioxidantes son proteínas y enzimas, mientras que otros son moléculas más pequeñas (Niki, 2010).

En el sistema antioxidante se encuentran varias moléculas que juegan un papel en la defensa antioxidante, se clasifican como endógenas y exógenas. Los antioxidantes pueden dividirse también a su vez por su mecanismo de acción, como antioxidantes de ruptura de cadena y como antioxidantes preventivos (Somogyi et al. 2007). Los antioxidantes primarios o de ruptura de cadena actúan como aceptores/captadores de radicales libres retrasando o inhibiendo la etapa de iniciación o interrumpiendo la etapa de propagación de la autooxidación (Wanasundara y Shahidi, 2005).



Reacción 2.2: Mecanismo de acción de los antioxidantes primarios (Antolovich et al. 2002)

Sistema antioxidante endógeno

Los antioxidantes preventivos reducen la velocidad de iniciación, como catalasas y otras peroxidasas que reaccionan con radicales hidroperoxilo y queladores como triacetato de etilendiamino (EDTA). *In vivo* los principales antioxidantes preventivos son las enzimas superóxido dismutasa (SOD) que captura el anión superóxido, la catalasa, que reduce al peróxido de hidrógeno y glutatión peroxidasa, que reduce a los hidroperóxidos orgánicos (Diplock et al. 1998). Constituyen la primera línea de defensa por la supresión de la formación de las ROS y RSN (Niki, 2010).

La **vitamina C** es considerado el más potente y menos tóxico de los antioxidantes naturales, es hidrosoluble y sus mayores fuentes en la dieta son las frutas (cítricos, kiwi, cerezas) y vegetales (brócoli, tomates, coliflor) (Diplock et al. 1998). La vitamina C es esencial en la prevención del escorbuto y es un importante cofactor en la hidroxilación de prolina a hidroxiprolina (Bouayed y Bohn, 2012).

El ácido ascórbico es una cetolactona de 6 carbonos, es estable en estado sólido pero en disolución se oxida fácilmente a ácido dehidroascórbico, es muy susceptible químicamente a la oxidación enzimática en los procesos de almacenamiento y cocinado de los alimentos (Ball, 2005; Romero et al. 2013). En la vitamina C, están incluidos dos compuestos el L-ácido ascórbico y el L-ácido dehidroascórbico (Carocho y Ferreira, 2012), sus estructuras químicas se muestran en la figura 2.3.

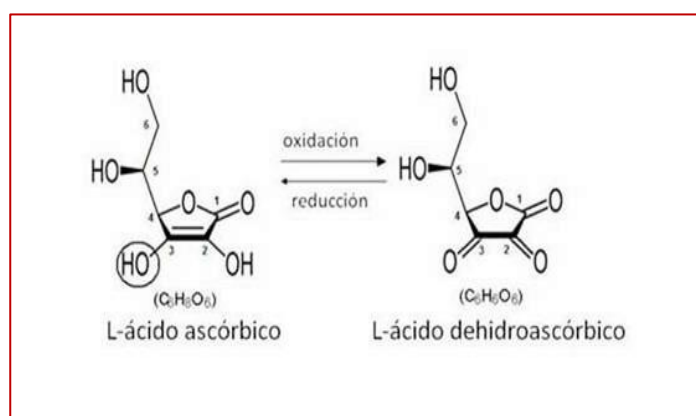


Figura 2.3: Estructura química del ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico. Modificado de Romero et al. (2013)

Como cofactor enzimático, una de sus funciones más específicas es el mantenimiento de los iones metálicos de las enzimas en el estado reducido requerido para el normal funcionamiento de la enzima, así en la biosíntesis de colágeno, en las tres enzimas implicadas prolil-4-hidroxilasa, prolil 3-hidrolasa y lisil hidroxilasa, la vitamina C mantiene el hierro en su estado ferroso el cual necesitan para desarrollar su actividad enzimática (Schlueter y Johnston, 2011).

La interacción más eficiente es la acción antioxidante sinérgica entre la vitamina C y la vitamina E. La vitamina C reduce el radical de la vitamina E para regenerar la vitamina E antes de que el radical ataque a los lípidos (Niki, 2010). Su acción antioxidante consiste en terminar con las reacciones en cadena por transferencia electrónica (Gülçin, 2012).

La **vitamina E** está formada por 8 vitámeros de diferente potencia biológica: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Los tocoferoles son derivados metilados del tocol formado por un anillo 6-cromanol unido en posición C₂ a una cadena lateral saturada isoprenoide, mientras que los tocotrienoles se diferencian porque tienen tres insaturaciones *trans* en la cadena lateral (Ball, 2005). Sus estructuras químicas se muestran en la figura 2.4.

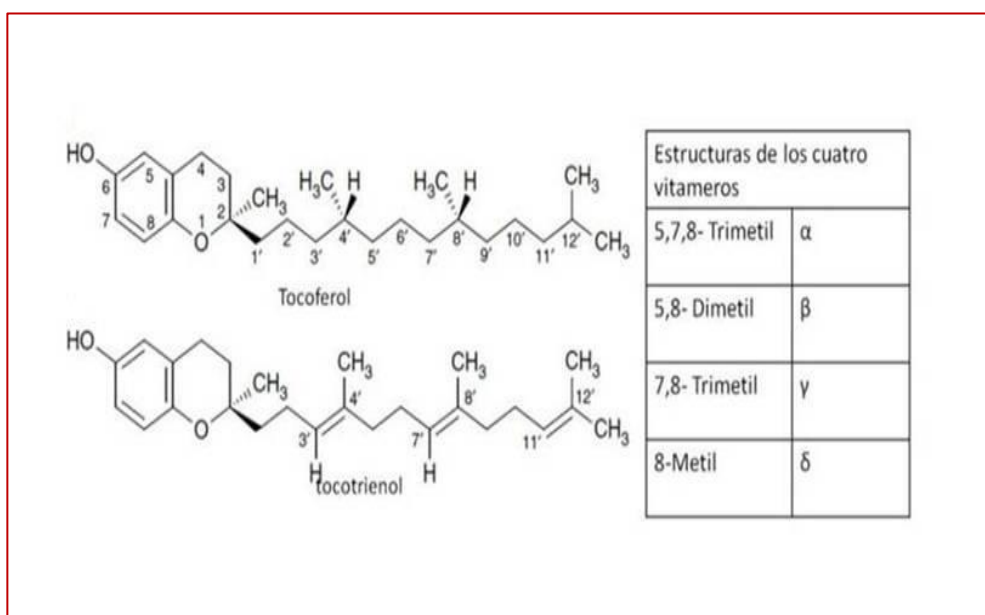


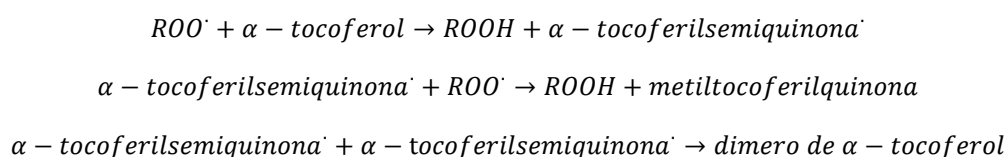
Figura 2.4: Estructuras químicas de tocoferoles y tocotrienoles. Adaptado de Ball (2005).

Los tocoferoles y tocotrienoles están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Los aceites vegetales son la fuente más concentrada de vitamina E, los tocotrienoles son menos comunes pero están presentes en el aceite de salvado de arroz, en cereales y legumbres y en altas concentraciones en el aceite de palma siendo la mayor fuente comercial para estos compuestos el aceite de soja refinado (Reische et al. 2002).

El α -tocoferol es una vitamina liposoluble, que está presente en las membranas celulares y los orgánulos. Los tocoferoles actúan como antioxidantes donando un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo a un radical lipídico peroxilo (Gülçin, 2012).

Como función biológica destaca la protección antioxidante de los fosfolípidos de las membranas celulares y subcelulares de la degeneración peroxidativa (Ball, 2005).

Su mecanismo de acción frente al radical peroxilo se desarrolla según el siguiente esquema:



Reacción 2.3: Neutralización de radicales peroxilo de α -tocoferol. Adaptado de Reische (2002)

Los **carotenoides** son sintetizados por las plantas y algunos microorganismos, pero no por los animales (Rao y Rao, 2007).

Son los principales pigmentos responsables de los colores de frutas y vegetales, que incluyen β -caroteno, luteína, zeaxantina y licopeno, este último es responsable del color rojo de los tomates, sandía, papaya, pomelo rosa y la guayaba rosa (Gülçin, 2012). En las plantas contribuyen en la maquinaria fotosintética y protegen a ésta del daño de la luz (Rao y Rao, 2007; Gülçin, 2012).

Químicamente son tetraterpenoides (C-40) que poseen potencial antioxidante. Hasta ahora hay unos 700 identificados de los cuales 40-50 especies juegan un papel en la dieta humana. Algunos de ellos son considerados nutrientes como el alfa-, beta- y gama caroteno y el alfa- y la beta-criptoxantina, que exhiben actividad de pro-vitamina A tras su metabolización a retinol en el organismo (Bouayed y Bohn, 2012).

Sus propiedades químicas se derivan de la presencia de un sistema extendido de dobles enlaces conjugados. Se diferencian por la ciclación del final de la cadena y la introducción de grupos que contienen oxígeno (Rao y Rao, 2007). Sus propiedades antioxidantes derivan de sus estructuras, pudiendo actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, neutralizadores del oxígeno singlete, neutralizadores del radical superóxido e incluso quelantes de metales (Carocho y Ferreira, 2012).

Los carotenoides son compuestos hidrófobos que actúan como antioxidantes lipófilos protegiendo a los ácidos grasos poliinsaturados del daño oxidativo. Actúan como antioxidantes de ruptura de cadena parando las reacciones radicalarias capturando hidroperóxidos lipídicos (Bouayed y Bohn, 2012).

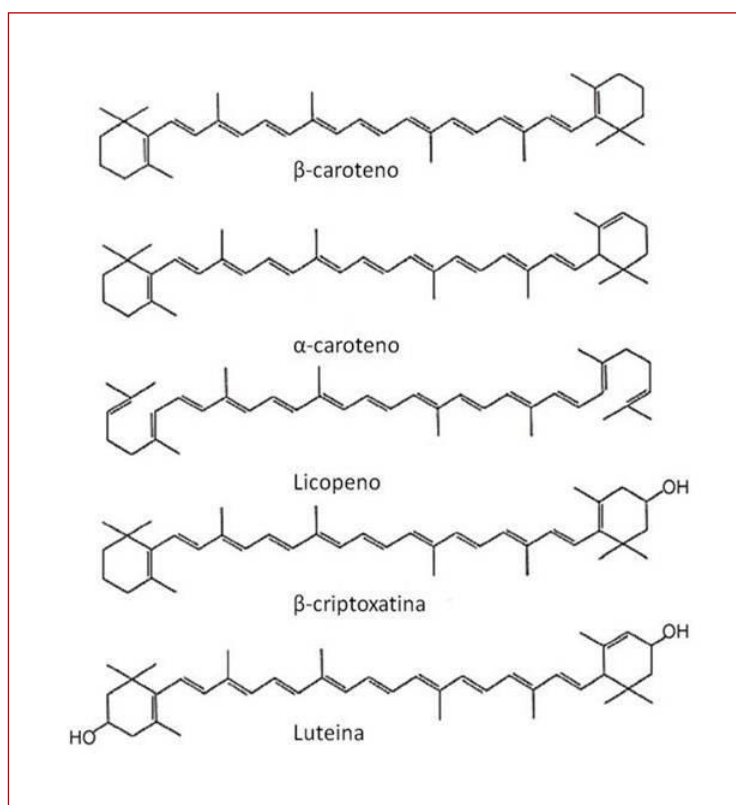


Figura 2.5: Estructuras químicas de los carotenoides. Adaptado de Rao y Rao (2007)

El mecanismo de acción como neutralizadores del oxígeno singlete, consiste en que éste le transfiere energía al β-caroteno produciéndose un β-caroteno a un estado triplete que se relaja perdiendo la energía en forma de calor. Los carotenoides son neutralizadores muy eficaces, así una molécula de β-caroteno es capaz de extinguir 1000 moléculas de oxígeno singlete (Reische et al. 2002).

Los **compuestos fenólicos** están formados por más de 8000 compuestos divididos entre varias clases, la mayoría de ellos existen en las plantas de forma glicosilada (Tsao, 2010).

Se acumulan en las plantas en elevadas cantidades y forman parte de su ciclo vital, ejerciendo funciones de tipo estructural, en el sistema de defensa, en la atracción para la polinización y animales dispersadores de semillas y como protectores de las plantas en su relación con el entorno (Jaganath y Crozier, 2010).

Los múltiples grupos hidroxilo en la estructura de los polifenoles les hacen ideales para reacciones de captación de radicales y agentes quelantes de metales. Su disposición en los anillos fenólicos es importante en las reacciones antioxidantes (Ndhlala et al. 2010).

La clasificación se basa en el número y la disposición de sus átomos de carbono (Crozier et al. 2006a). Los polifenoles se pueden clasificar en dos grupos: flavonoides y no flavonoides (Crozier et al. 2006a), dentro de estos últimos los más destacados son: ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (Scalbert y Williamson, 2000).

Los **flavonoides** son los polifenoles más abundantes de la dieta (Ignat et al. 2011), su estructura se basa en el esqueleto de 2-fenil-benzo- α -pirona, formado por dos anillos fenilo (A y B) unidos por un heterociclo, en todos ellos puede distinguirse la siguiente disposición C₆-C₃-C₆ (Wickowski y Piskula, 2004). Se dividen en flavonoles, flavonas, flavononas, flavanoles o flavan-3-ol, antocinidinas, e isoflavonas (Crozier et al. 2006a).

Los **flavonoles** son los compuestos más ampliamente distribuidos en el reino vegetal a excepción de las algas y hongos: son miricetina, quercetina, kaempferol e isoramnetina, más comúnmente encontrados como O-glucósidos (Crozier et al. 2006a). Se encuentran típicamente glicosilados en posiciones 5, 7, 4', 3' y 5'. Las cebollas blancas y rojas son una fuente de flavonoles que contienen altas concentraciones de quercetina-4'-O-glucósido y de quercetina-3,4'-O-glucósido (Del Rio et al. 2013).

Las **flavonas** son estructuralmente similares a los flavonoles aunque no presentan hidroxilación en el carbono C₃, y son mucho menos comunes que los flavonoles en frutas y verduras. Las flavonas están formadas principalmente de glucósidos de luteolina y apigenina (Manach et al. 2004).

Se encuentran en perejil, apio y achicoria (Jaganath y Crozier, 2010). La principal fuente de apigenina es el perejil mientras que de la luteolina son la salvia y el tomillo (Kyle y Duthie, 2006). Su rango de sustituciones incluyen hidroxilación, metilación O- y C- alquilación y glicosilación (mayoritariamente forman 7-O-glucósidos) (Crozier et al. 2006a)

Tabla 2.2: Estructura química de compuestos fenólicos clasificados por familias

Compuestos fenólicos			Estructura química	Ejemplos	Fuentes dietéticas
Flavonoides	Flavonoles			Quercetina Kaempferol	Cebollas
	Flavonas			Apigenina Luteolina	Apio Perejil
	Flavanonas			Hesperidina Naringenina	Naranja Pomelo
	Flavanoles Proantocianidinas			Catequina Epicatequina	Té Chocolate negro
	Antocianidinas			Cianidina Delfinidina	Uvas Grosella negra
	Isoflavonas			Daidzeína Genisteína	Soja
No flavonoides	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos		Ácido gálico Ácido elágico	Té verde Moras Frambuesas
		Ácidos hidroxicinámicos		Ácido caféico Ácido ferúlico	Café
	Estilbenos			Resveratrol	Uva Vino Tinto
	Lignanós			Enterodiol	Linaza

Las polimetoxiflavonas, nobiletina y tangeritina, se han encontrado en especies cítricas (Crozier et al. 2006a).

Las **flavanonas** presentan un centro quiral en posición C_2 , lo que les proporcionan una alta reactividad, pueden sufrir hidroxilación, glicosilación y *O*-metilación. Están presentes en altas concentraciones en los cítricos (Crozier et al. 2006a).

Las principales agliconas son hesperidina, naringenina y eriodictiol; su *O*-glicosilación normalmente se da en C_7 (Gattuso et al. 2007). La flavonona más común es la hesperidina-7-*O*-rutinósido (hesperidina) que se encuentra en la piel de los cítricos (Crozier et al. 2009).

Los **flavan-3-ol o flavanoles** son un grupo complejo formado por monómeros (catequina y epicatequina), oligómeros o polímeros como las proantocianidinas. Se ha detectado en vino, chocolate negro y té verde (Crozier et al. 2006a; Soto-Vaca et al. 2012).

Poseen dos centros quirales en posiciones C_2 y C_3 , por cada hidroxilación se producen cuatro isómeros (Crozier et al. 2009). Los flavanoles están presentes en las plantas como agliconas, como oligómeros o esterificados con ácido gálico (Fraga y Oteiza, 2011). Catequina y epicatequina son los mayoritarios en las frutas mientras que galocatequina, epigalocatequina y galato de epigalocatequina se encuentran en ciertas semillas de leguminosas, en uvas, y más significativamente en té (Manach et al. 2004).

Las **proantocianinas**, también conocidas como taninos condensados, están formadas por varias unidades de flavon-3-ol, se subdividen en dos grandes categorías basándose en la hidroxilación del anillo B de las unidades consecutivas que lo forman, así las procianidinas tienen dos grupos hidroxilo vecinales y las prodelphinidinas tres (Déprez et al. 2000; Hellström et al. 2009; Gu, 2012). Su nombre refleja el hecho que tras una hidrólisis ácida se dividen en antocianinas coloreadas (Dixon et al. 2005).

Su función en la planta es la protección contra patógenos microbianos, ataques de insectos y de grandes herbívoros (Dixon et al. 2005).

Las principales fuentes de proantocianidinas son las uvas pasas, el chocolate amargo, y avellanas (Gu et al. 2004).

Las **antocianinas** son un grupo importante de flavonoides, que es responsable de los colores cian (azul), comprendidos del rosa salmón pasando por el rojo y el violeta al azul oscuro de la mayoría de las flores, las frutas y las hojas de angiosperma (Andersen y Jordheim, 2006). En la planta su función principal es protegerla de la excesiva luz, además tienen una función importante en la atracción para la polinización (Crozier et al. 2006a).

Aunque se han detectado 31 antocianinas monoméricas el 90 % están basadas estructuralmente en las antocianidinas siguientes: cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina, petunidina y pelagordina (Andersen y Jordheim, 2006).

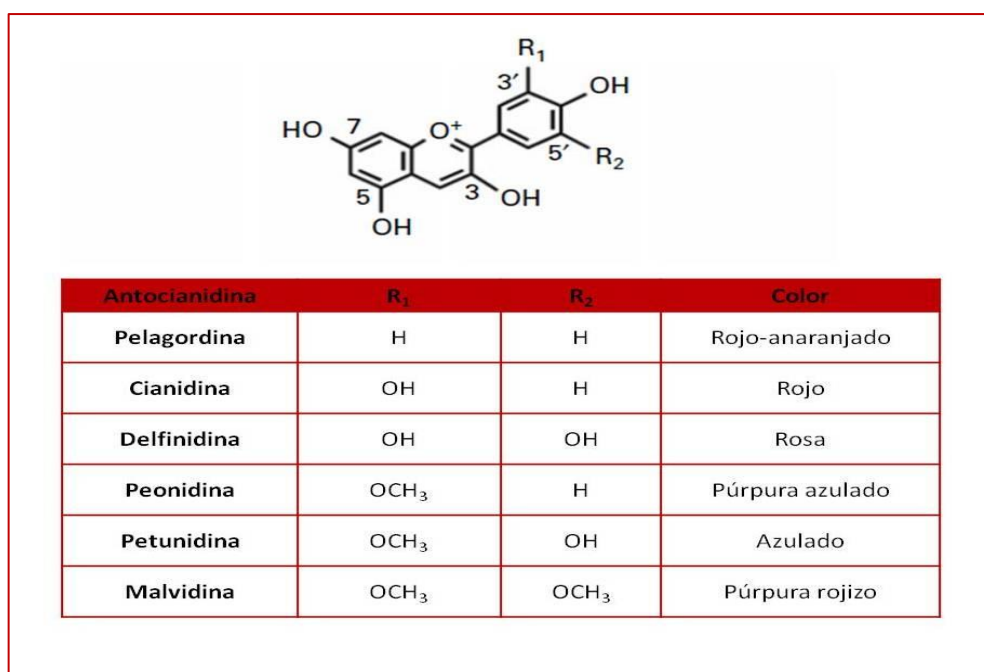


Figura 2.6: Estructura química de las antocianidinas, adaptado de Del Rio et al. (2010a)

Las antocianinas son antocianidinas unidas a uno o más restos de azúcar. Los más comunes son glucosa, galactosa, xilosa, rammnosa y arabinosa, son frecuentes los disacáridos como rutinosa, soforosa y sambubiosa o los trisacáridos como 2-xilosilrutinosa y glucurosilrutinosa (Skrede y Wrolstad, 2002; Hidalgo-Jerez, 2013). Esta glicosilación les confiere mayor estabilidad e incrementan su solubilidad en agua respecto de las antocianidinas (Skrede y Wrolstad, 2002). Se encuentran conjugadas con azúcares y también con hidroxycinamatos y ácidos orgánicos (Crozier et al. 2006a).

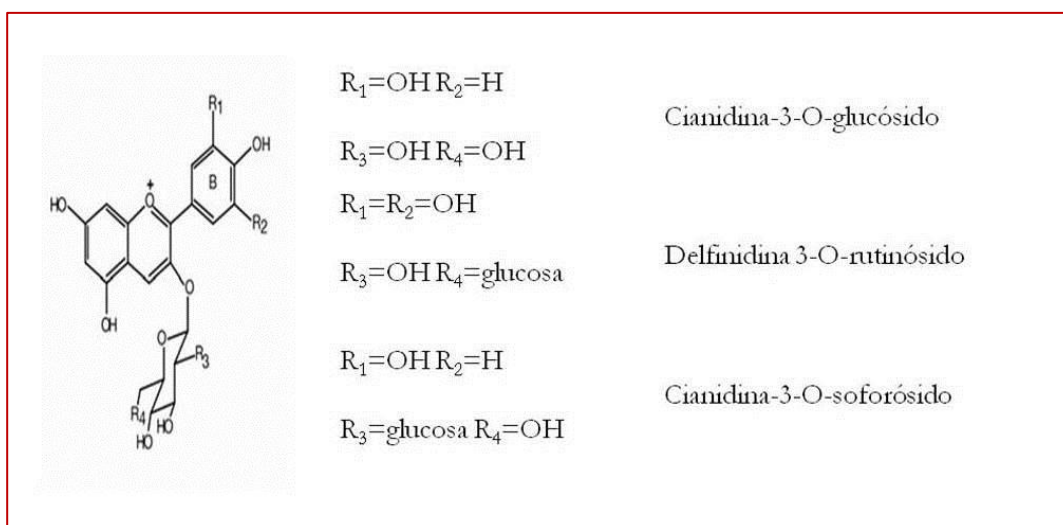


Figura 2.7: Estructura química de las antocianinas, adaptado de Chopra et al. (2006) y Crozier et al. (2006b)

Algunas frutas como el sauco y las grosellas rojas contienen un tipo de antocianinas específicas, mientras que otras bayas como los arándanos azules y las grosellas negras contienen varios tipos de antocianidinas (Soto-Vaca et al. 2012).

Las **isoflavonas** presentan en su estructura una diferencia con los demás flavonoides el anillo B está en posición C_3 . Las principales isoflavonas son genisteína y daidzeína. Presentan actividad estrógena llegando a competir con los estrógenos (Crozier et al 2006a). Las mayores concentraciones de isoflavonas se encuentran en la soja y productos derivados (Crozier et al. 2009).

Los **compuestos fenólicos no flavonoides** son principalmente los ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), los estilbenos y los lignanos.

Los **ácido fenólicos** se dividen en dos grupos: ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (El Gharras, 2009). Su estructura consiste en un benceno unido a un grupo carboxílico (ácidos benzoicos o hidroxibenzoicos) o a un ácido propenóico (ácidos hidroxicinámicos), las variaciones en la estructura de los distintos ácidos se deben a las hidroxilaciones o metoxilaciones del anillo aromático (Lafay y Gil-Izquierdo, 2008).

Se incluyen dentro de las familias de polifenoles de las plantas ya que son los precursores de los polifenoles y la razón más importante, es que los ácidos fenólicos son metabolitos de los polifenoles (Zambonin et al. 2012).

En las plantas pueden encontrarse libres pero también conjugados (normalmente esterificado) con azúcares simples, ácidos orgánicos y polímeros de las plantas (Russell y Duthie, 2011).

No están distribuidos homogéneamente a lo largo de los tejidos vegetales. Además, existe una gran variabilidad encontrada en distintas etapas de maduración. Todavía son desconocidas las funciones concretas de los ácidos fenólicos en las plantas, aunque se han relacionado con algunas como la absorción de los nutrientes, la síntesis de proteínas, actividad enzimática, fotosíntesis, componentes estructurales y alelopatía (Robbins, 2003).

Los **ácidos hidroxibenzoicos** más comunes son los ácidos vanílico, *p*-hidroxibenzoico, síringico, protocatéquico y gálico (Bravo et al. 1998; Manach et al. 2004). Su contenido en las partes comestibles de las plantas es generalmente bajo, con la excepción de las frutas rojas, el ruibarbo rojo y la cebolla, las cuales pueden llegar a tener concentraciones de decenas de miligramos por kilogramo de peso fresco (Manach et al. 2004).

El ácido hidroxibenzoico más importante es el ácido gálico (Crozier et al. 2006a), junto con su derivado dimérico, el ácido elágico. En las fresas, frambuesas, arándanos azules, el té negro, el vino tinto y las nueces, se encuentran en forma libre o formando parte de estructuras más complejas como los taninos hidrolizables (Donovan et al. 2006), son compuestos que contienen un núcleo central de glucosa u otro poliol esterificado con ácido gálico o su dímero hexahidrodifenoilo, obteniéndose respectivamente galotaninos y elagitaninos (Vladimir-Knežević et al. 2012), que pueden romperse fácilmente, obteniéndose ácido gálico o elágico.

Los taninos hidrolizables son los principales responsables de la astringencia de algunas frutas y verduras (Crozier et al. 2006a).

Los **ácidos hidroxicinámicos** más comunes son el *p*-cumárico, caféico y ferúlico (Crozier et al. 2006a; Lafay y Gil-Izquierdo, 2008). El ácido caféico es el ácido más común encontrándose en más de un 70 % de las frutas, el ácido ferúlico es el más abundante en granos de cereales (Manach et al. 2004). Normalmente los ácidos hidroxicinámicos se encuentran esterificados con ácido quínico, ácido tartárico o derivados de hidratos de carbono (Lafay y Gil-Izquierdo, 2008).

Dentro de los ácidos conjugados, los formados por el ácido quínico y el ácido caféico, como 3,4 y 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico), se encuentran en gran variedad de frutas y vegetales (Crozier et al. 2006a), siendo su mayor fuente las bayas o cerezas de café (Clifford, 1999).

Los **estilbenos** presentan una estructura $C_6-C_2-C_6$, son compuestos producidos por las plantas por ataque fúngico, bacteriológico o viral. El más conocido es el resveratrol que presenta dos isómeros: *cis* y *trans*. (Crozier et al. 2006a).

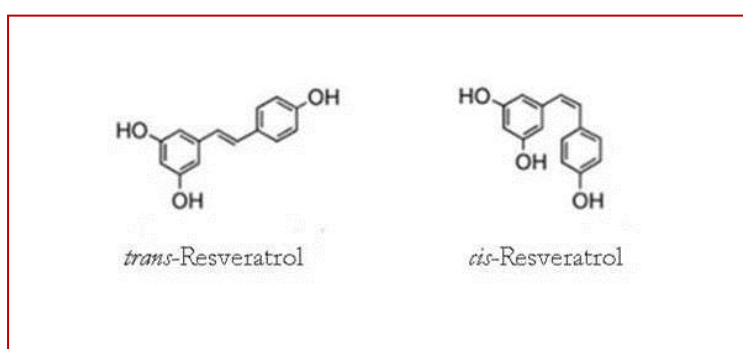


Figura 2.8: Estructura química de los isómeros del resveratrol. Adaptado de Crozier et al. (2006b)

Las mayores fuentes de resveratrol son las uvas, vino, soja y cacahuete (Crozier et al. 2006a). El *trans*-resveratrol ha causado un significativo interés, ya que tiene la habilidad de inhibir o retardar enfermedades como las cardiovasculares y cáncer (Crozier et al. 2009).

Los **lignan**os son compuestos derivados de dos fenilpropanoides β - β' enlazados (Andrés-Lacueva et al. 2012). Se encuentran principalmente en aceites de semillas (linaza, soja, colza, y sésamo), en cereales como trigo, avena y centeno, y en frutas especialmente en las bayas (Durazzo et al. 2013).

3. REVISIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Muchos de los estudios de estos últimos años se han centrado en el estudio de la capacidad antioxidante de los distintos alimentos y sus posibles efectos beneficiosos para la salud humana. Por este motivo se han desarrollado distintos métodos para su evaluación.

Los términos actividad antioxidante y capacidad antioxidante a menudo se usan indistintamente, aunque debería reconocerse que tienen distintos significados. La actividad se refiere a la constante de velocidad entre un antioxidante específico y un oxidante específico. La capacidad es una medida de la cantidad de un radical libre u otro compuesto capturado o reducido por una muestra (MacDonald-Wicks et al. 2006), normalmente expresado en concentración molar referida a un estándar.

Para la evaluación de la capacidad antioxidante se han desarrollado gran variedad de métodos de determinación *in vitro*.

Existen varias maneras de clasificar los métodos de medir de capacidad antioxidante atendiendo a diferentes criterios:

- Su aproximación biológica: directos o indirectos (Roginsky y Lissi, 2005; Laguerre et al. 2007).
- Tipo de reacción química: competitiva y no competitiva (Magalhaes et al. 2008).
- Mecanismo químico redox: transferencia de átomo de hidrógeno y transferencia electrónica (Huang et. al 2005; Prior et al. 2005; Karadag et al. 2009).

Los dos factores que determinan el mecanismo químico redox y la eficacia de los antioxidantes son la energía de enlace y el potencial de ionización (Prior et al. 2005).

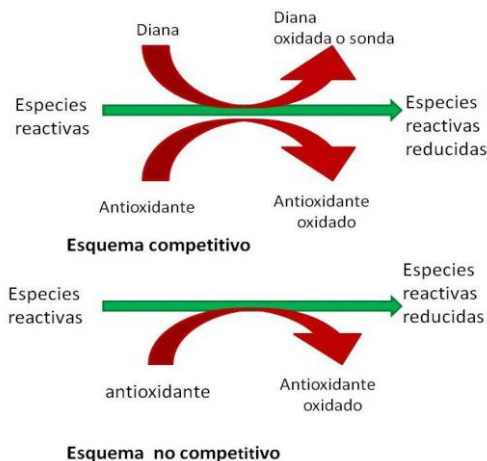
Para el desarrollo de estos métodos Magalhaes et al, (2008) propusieron una serie de requerimientos:

- Medida química con varias aplicaciones potenciales.
- Utilización de moléculas biológicamente relevantes.
- Técnicamente simple.
- Con punto final definido y mecanismo químico definido.
- Instrumentación fácilmente adquirible.
- Buena repetitibilidad y reproducibilidad.
- Adaptable a antioxidantes hidrófilos y lipófilos.
- Adaptables a gran escala.

Los métodos directos son aquellos en los que involucran un sustrato oxidable. En los métodos directos los sustratos oxidables corresponden a moléculas o extractos naturales con actividad biológica, como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. Se basan en los efectos inhibitorios de una sustancia potencialmente antioxidante sobre la degradación oxidativa de ese sustrato en un sistema de ensayo sujeto a condiciones oxidantes naturales o aceleradas. Mientras que la aproximación indirecta consiste en la capacidad de una molécula de neutralizar radicales artificiales estables o de la capacidad de reducir metales de transición (Roginsky y Lissi, 2005; Laguerre et al. 2007).

Por lo general los métodos competitivos (esquema 3.1) presentan un mecanismo transferencia de átomo de hidrógeno. Estos involucran una **diana** (sustrato oxidable), consistente normalmente en lípidos o mezcla de los mismos (Laguerre et al. 2007), que es oxidada por la especie reactiva (radical o no radical) bajo estudio, y después de la oxidación se mide la **sonda** (generalmente la forma oxidada de la diana). Una vez añadidos los antioxidantes estos van a competir con la diana por las especies reactivas produciendo la inhibición de la oxidación de la diana, ya que los antioxidantes reaccionaran con las especies reactivas, reduciéndoles de tal forma que no se seguirá produciendo la oxidación de la diana (Magalhaes et al. 2008).

Esquema 3.1: Representación de los tipos de reacciones químicas que se producen en los ensayos de capacidad antioxidante. Adaptado de Magalhaes et al. (2008)



Las reacciones con mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno son dependientes del disolvente, generalmente rápidos, completados de segundos a minutos (Prior et al. 2005).

Además es importante tener en cuenta que los métodos de transferencia de átomo de hidrógeno son influenciados por diversas variables como la temperatura, el medio de reacción y el pH. También es necesario conocer las sustancias interferentes que pueden llegar a producir una sobrestimación o incluso falsos positivos (Laguerre et al. 2007).

Es necesario tener en cuenta que la cuantificación de los resultados se realiza de las siguientes formas posibles según Antolovich et al. (2002):

- Medida de un punto a un tiempo fijado. Se cuantifica después de un intervalo de tiempo determinado.
- Medida de la velocidad de reacción.
- Medida de la fase de latencia (el tiempo en el que a bajas concentraciones de antioxidante, éste se consume totalmente en su acción con los radicales libres (Halliwell, 1995). Se cuantifica el tiempo en el cual la señal esta extinguida durante la acción de los antioxidantes (Fedorova et al. 2007).
- Integral del tiempo de medida. Se cuantifica el área encerrada bajo la curva cinética.

En los métodos con mecanismo transferencia de átomo de hidrógeno, los resultados se expresan en función de la sonda por decaimiento del sustrato, por consumo de oxígeno, por formación de productos de oxidación o por decaimiento de radicales libres (Antolovich et al. 2002).

En los métodos no competitivos, que presentan generalmente un mecanismo de transferencia electrónica, son las propias especies reactivas (dianas), normalmente moléculas artificiales (Laguerre et al. 2007), empleadas como sonda en su forma reducida y se mide su cambio de color (Magalhaes et al. 2008). La intensidad del cambio de color está relacionada con la concentración de los antioxidantes en la muestra. Estos ensayos se establecen con carácter general a un tiempo fijo para la reacción redox que se trate (Apak et al. 2008).

Cada uno de los métodos desarrollados tiene una característica única y las diferencias existentes se encuentran en la generación del sistema de radicales libres, en la diana molecular, en el punto final, la adecuación a antioxidantes lipófilos o hidrófilos y en la relevancia fisiológica (Phipps et al. 2007).

Schlesier et al. (2002), recomiendan que debido a estas diferencias encontradas entre los métodos, al menos deben emplearse dos de ellos para determinar la capacidad antioxidante y utilizar más de un estándar, ya que los antioxidantes responden de distintas maneras a las diferentes especies reactivas, en los distintos ensayos (Seeram et al. 2008). Lo más importante es conocer desde el principio que no existe un método sencillo y universal por el cual se puede medir la capacidad antioxidante de forma precisa y cuantitativa (Prior et al. 2005).

Dentro de los métodos químicos *in vitro* desarrollados por los distintos autores podemos distinguir distintos tipos de aproximaciones:

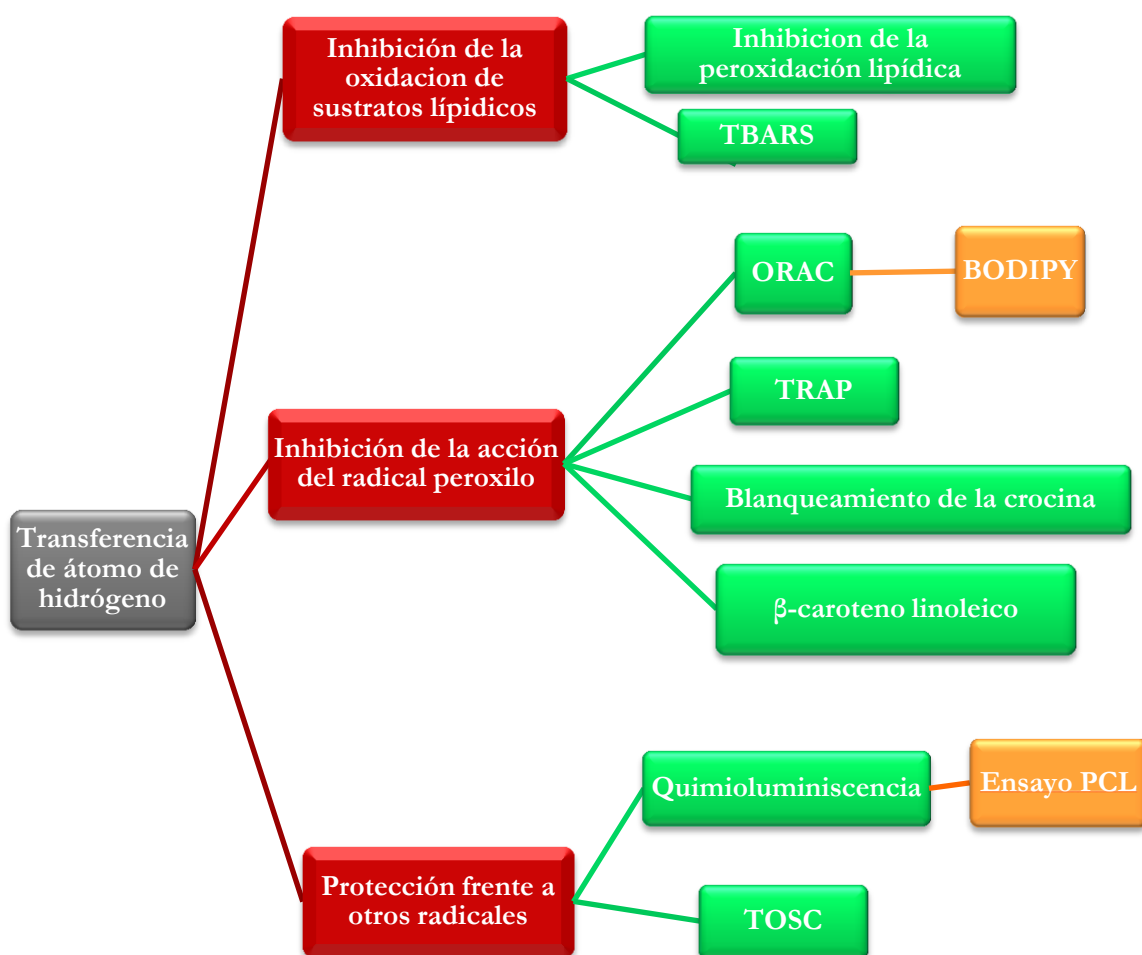
- Inhibición de la oxidación de sustratos lipídicos.
- Inhibición de la acción del radical peroxilo.
- Protección frente a otros radicales libres.
- Neutralización de radicales artificiales.
- Capacidad reductora sobre iones metálicos.
- Neutralización de otras especies reactivas.

Cada una de las aproximaciones químicas se puede enmarcar dentro de los mecanismos químicos redox, de transferencia de átomo de hidrógeno y de transferencia electrónica.

3.1. MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE ÁTOMO DE HIDRÓGENO

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos de análisis de capacidad antioxidante pueden clasificarse en función del mecanismo químico y redox y dentro de ellos, en función de sus distintas aproximaciones químicas (esquema 3.2).

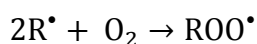
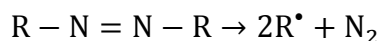
Esquema 3.2: Clasificación de los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante con mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno



3.1.1. Inhibición de la oxidación de sustratos lipídicos

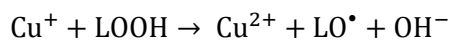
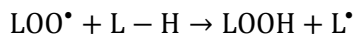
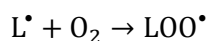
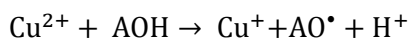
A) Inhibición de la peroxidación lipídica

La oxidación del ácido linoleico o de lipoproteínas de baja densidad (LDL), se lleva a cabo por radicales peroxilo los cuales provienen de la descomposición térmica de un azo-iniciador como 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) o 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN). Los azo-iniciadores son compuestos termolábiles que producen fácilmente radicales libres. Está aceptado que siguen el siguiente mecanismo para la producción de radicales libres (Hanlon y Seybert, 1997), donde L-H es la molécula diana del experimento:



Reacción 3.1: Descomposición térmica de los azo-iniciadores (Hanlon y Seybert, 1997)

También se ha empleado como iniciador Cu (II), que por sí sólo no produce la oxidación de los lípidos, sino que reacciona con algún antioxidante presente en las LDL como por ejemplo el α -tocoferol que reaccionaría con el ion cúprico produciéndose la generación de radical y este reacciona con las LDL obteniéndose la oxidación de las LDL (Huang et al. 2005).



Reacción 3.2: Formación de radicales peroxilo a partir del ion cúprico (Huang et al. 2005)

Como dianas o sustratos oxidables se emplean LDL aisladas de diversos sujetos, linoleato de metilo o ácido linoleico. Para la monitorización se emplea un sistema en continuo o en alícuotas, el primero de ellos mejora la productividad del ensayo (Roginsky y Lissi, 2005).

La reacción puede llevarse a cabo en disolventes orgánicos o micelas. En este último caso no se puede emplear un espectrofotómetro UV para su análisis (Huang et al. 2005).

La cuantificación se realiza por consumo de oxígeno, por el índice de liberación de peróxidos (por iodimetría), por la detección de dienos conjugados a una longitud de onda de 234 nm o por la descomposición de los productos de degradación de la peroxidación lipídica. Entre estos métodos de cuantificación el más empleado es la medida de absorción de los dienos conjugados ya que no requiere una separación previa y permite realizarlo en continuo (Roginsky y Lissi 2005; Sánchez-Moreno y Larrauri, 1998).

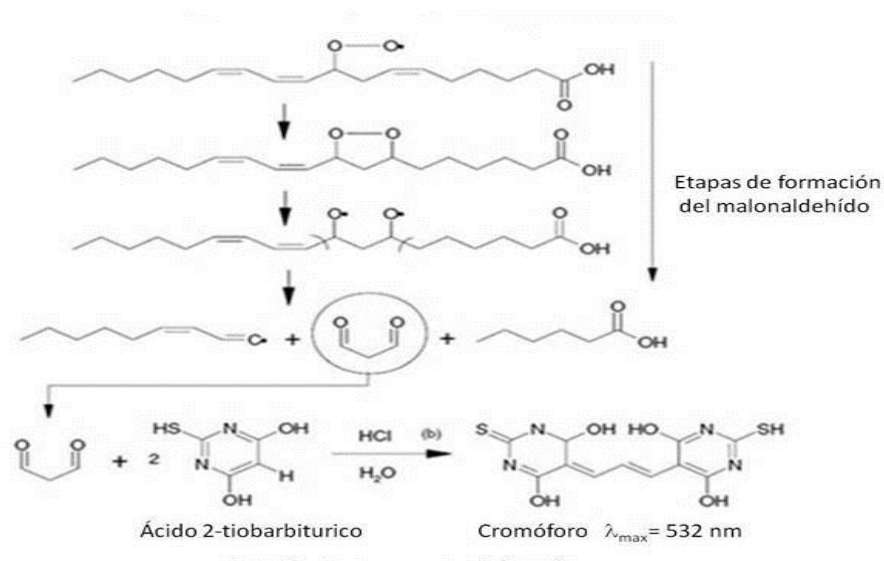
En cuanto a las dianas o los sustratos oxidables el empleo de componentes comerciales facilita la repetitibilidad del método (Roginsky y Lissi, 2005). La oxidación de las LDL en cambio al estar aisladas de muestras de sangre de diversos individuos pueden provocar fallos en la reproducibilidad del ensayo (Prior et al. 2005).

El empleo de azo-iniciadores supone una ventaja ya que el grado de producción de los radicales peroxilo es proporcional a la concentración del iniciador (Roginsky y Lissi, 2005). Además se ha demostrado que empleando AAPH como iniciador existe una buena correlación con el método *Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay* (ORAC) (Prior et al. 2005). En cambio el empleo de Cu (II) como iniciador puede actuar como catalizador en presencia de antioxidantes y estos como pro-oxidantes (Huang et al. 2005).

B) *Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)*

La primera etapa del método se lleva a cabo por la oxidación de la molécula diana por el flujo constante de radicales generado por un azo-iniciador, produciendo la oxidación de la misma y los productos de oxidación hidroperoxilados se condensan produciendo malondialdehído (MDA).

En la segunda etapa el MDA producido reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA), formando un cromógeno rojo que se mide a 532 nm (Laguerre et al. 2007). La oxidación es inhibida por la acción de los antioxidantes, lo que produce una disminución de la absorbancia (Antolovich et al. 2002).



Reacción 3.3: Formación del MDA y reacción con el TBA, obteniéndose el cromógeno.
Adaptación de Laguerre et al. (2007)

La diana puede ser tejido cerebral (Morales et al. 2012), LDL aislada o ácido linoleico (Antolovich et al. 2002).

Este método presenta dos grandes defectos, el primero es que sólo se forma MDA a partir de cadenas de ácidos grasos que contienen al menos tres dobles enlaces, como el ácido linolénico, con exclusión de los productos de descomposición de los ácidos linoleico y oleico (Laguerre et al. 2007). En segundo lugar, TBA no es específico de MDA, ya que puede reaccionar con otros aldehídos, formando un cromógeno amarillo (Fernández et al. 1997), interfiriendo en la medida de la reacción del TBA y MDA. Los compuestos interferentes en los ensayos en alimentos, pueden ser proteínas, productos de la reacción de Maillard o productos de la degradación de los azúcares (Gülçin, 2012).

3.1.2. Inhibición de la acción del radical peroxilo

A) *Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (ORAC)*

Es un método competitivo que emplea una diana fluorescente y se evalúa la intensidad de decaimiento de la fluorescencia. En un principio consistía en la oxidación de la proteína con un generador de radicales peroxilo obteniéndose un producto no fluorescente. Los antioxidantes inhibirían la formación de esta última proteína (Magalhaes et al. 2008). Se mide cada minuto durante 35 a pH 7,4 y una temperatura de 37 °C (Laguerre et al. 2007).

En su primera versión se empleaba como diana β -ficoeritrina proteína aislada de *Porphyridium cruentum*, ésta presentaba una serie de desventajas:

- Gran variabilidad de reactividad con los radicales peroxilo, provocando inconsistencia en los resultados.
- Se producía fotoblanqueamiento de la proteína, después de una exposición a la luz.
- Las proantocianidinas podían enlazarse con ella por un enlace no específico (Prior et al. 2005).

Ou et al. (2001) cambiaron la diana por fluoresceína, que es fotoestable en comparación con la anterior diana, además de poder adaptarla a microplaca de 96 pocillos.

La fluoresceína mejoraba los problemas de precisión, exactitud y robustez, así como la especificidad de la acción antioxidante y la relación lineal entre el área encerrada bajo la curva (*Area Under Curve*, AUC) y la concentración del antioxidante (MacDonald-Wicks et al. 2006).

Una de las mayores ventajas de este método es su cuantificación por la integración del AUC, ya que toma la velocidad de la reacción y la extensión de la inhibición (Magalhaes et al. 2008). Además se aplica tanto a los antioxidantes que tienen fase de latencia como a los que no la tienen (MacDonald-Wicks et al. 2006).

Debido a que el ORAC sólo se aplica para sustratos hidrófilos se han desarrollado unas variaciones de este método con el empleo de ciclodextrinas (Prior et al. 2003) o bien con el cambio de la diana como es el caso del método descrito a continuación.

♦ BODIPY

BODIPY (4,4-difloro-4-bora-3a,4a-diaza-S-indaceno), es una diana que se emplea para la cuantificación de antioxidantes lipófilos que actúan como neutralizadores de radicales peroxilo.

Tanto su cuantificación como su procedimiento son similares al ORAC. La oxidación de BODIPY, se lleva a cabo por los radicales peroxilo generados por el azo iniciador lipófilo AMVN que se emplea en medio orgánico, en octano o butironitrilo (Naguib et al. 2000; Gomes et al. 2005). Se emplea ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (trolox), análogo hidrosoluble a la vitamina E, como referencia (Laguerre et al. 2007).

La capacidad antioxidante de una muestra se determina a partir de su capacidad para retener la señal de fluorescencia del indicador en la presencia de radicales peroxilo. Se calcula también al igual que el ORAC mediante el AUC (Naguib, 2000).

Se expresa en porcentaje de inhibición y se obtienen mejores resultados en extractos combinados acuosos y orgánicos, ya que producen mayor inhibición que sólo los extractos lipófilos (Li et al. 2009). BODIPY presenta una característica desfavorable ya que se degrada a sí misma en condiciones de alta intensidad de iluminación (Gomes et al. 2005). Es 100 veces menos selectivo que el ORAC (Huang et al. 2005).

B) *Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP)*

Es un método competitivo en el que los radicales peroxilo, compiten con los antioxidantes por la molécula diana. De este método existen varias versiones con diferentes dianas, con diferentes procedimientos instrumentales para obtener los resultados de capacidad antioxidante, aunque todos estos experimentos presentan como medida de expresión de la capacidad antioxidante, la duración de la fase de latencia o periodo de inducción.

El método se basa en la capacidad de los azo-iniciadores, como AAPH, de descomponerse, produciendo un flujo de radicales peroxilo a un ritmo constante dependiente de la temperatura. Estos radicales tienen la energía suficiente para abstraer un átomo de hidrógeno desde un sustrato lipídico e iniciar una peroxidación en cadena (Hanlon y Seybert, 1997).

En la primera versión del método, desarrollada por Wayner et al. (1985), se empleaba el plasma como la diana. Debido al ataque de los radicales peroxilo se producía la oxidación de los sustratos oxidables que se controlaba por la medición del consumo de oxígeno (Sánchez-Moreno, 2002). Para ello se empleaba un electrodo de oxígeno tipo Clark (Wayner et al. 1987).

El periodo de inducción o fase de latencia es el tiempo transcurrido durante la inhibición de la peroxidación de los sustratos oxidables por parte de los antioxidantes presentes en el plasma (Wayner et al. 1985; Magalhaes et al. 2008). Durante el periodo de inducción, la oxidación es inhibida por los antioxidantes (Somogyi et al. 2007; Gülçin, 2012).

Una de las mayores desventajas de este ensayo era que el electrodo no mantenía su estabilidad durante todo el tiempo del ensayo. Para evitarlas se realizaron versiones posteriores del método, en que la detección se realiza por luminiscencia.

Se basa en la luminiscencia mejorada por parte de los radicales peroxilo, con una tasa de producción conocida, al luminol (sonda lumínica o sustancia fotosintetizadora), produciendo luminol radical (Lissi et al. 1995). Al añadir el antioxidante, la luminiscencia se extingue. La duración de esta fase es directamente proporcional a la capacidad de atrapar radicales de la muestra antioxidante (Antolovich et al. 2002).

Esta versión presenta alta sensibilidad de las mediciones de luminiscencia nos permite llevar a cabo las pruebas a baja temperatura (21°C) con una baja tasa de producción de radicales, haciendo posible la evaluación de las concentraciones micromolar y submicromolar de antioxidantes (Lissi et al. 1995).

La tercera versión del método se basa en la protección por parte de los antioxidantes de una diana fluorescente (R-ficoeritrina), midiendo el decaimiento de esta fluorescencia provocado por el ataque por los radicales peroxilo (Ghiselli et al. 2000). La cuantificación se realiza por la duración de la fase de latencia. Esta versión del método fue usada por Pellegrini et al. (2003) para establecer un ranking de capacidad antioxidante entre distintas frutas, vegetales y bebidas.

La principal desventaja de este método es que el valor obtenido únicamente por la fase de latencia subestima los resultados ya que no cuantifica lo que sucede después de ella (Karadag et al. 2009). Además no todos los antioxidantes muestran fase de latencia (Huang et al. 2005).

C) **Blanqueamiento de la crocina**

Se basa en la capacidad de los antioxidantes para proteger a un derivado carotenoide de la oxidación por parte de los radicales peroxilo. Consiste en la monitorización de la velocidad de decoloración de la crocina, pigmento derivado del azafrán, debido a la oxidación producida por los radicales peroxilo generados a partir del azo-iniciador AAPH, y se realiza a 443 nm durante 10 minutos. Los antioxidantes compiten con los radicales por la crocina. (Magalhaes et al. 2008). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del blanqueamiento (Ordoudi y Tsimidou, 2006).

Quizás una de sus mayores desventajas sea la cuantificación, ya que se realiza en función de las constantes de velocidad de la reacción de blanqueamiento, lo que requiere una recta de regresión de seis puntos para cada análisis de muestras y por triplicado (Ordoudi y Tsimidou, 2006), lo que hace que no sea un ensayo aplicable como método de rutina.

La crocina no es un producto comercial lo que le confiere gran variabilidad (Magalhaes et al. 2008), además debido a la longitud de onda donde se degrada, su aplicación alimentaria se ve limitada ya que absorben gran cantidad de sustancias que se encuentran en los alimentos (Roginsky y Lissi, 2005). Para eliminar las posibles interferencias es necesario un blanco sin crocina (Huang et al. 2005).

D) β -caroteno-ácido linoleico

Consiste en la decoloración del β -caroteno por la acción de los radicales del ácido linoleico (Barros et al. 2007). El mecanismo del blanqueamiento se produce debido al ataque de los hidroperóxidos, formados desde el ácido linoleico, que atacan las insaturaciones del β -caroteno, lo que provoca que los dobles enlaces se oxiden y pierda su color naranja característico (Jayaprakasha et al. 2001).

Esta pérdida de color se monitoriza espectrofotométricamente a 470 nm, la absorbancia decrece rápidamente en muestras sin antioxidantes, mientras que en las que los tienen se retiene el color y de este modo la absorbancia. La absorbancia se recoge a intervalos de 20 minutos y se cuantifica como EC₅₀ (Barros et al. 2007).

3.1.3. Inhibición frente a la acción de otras especies reactivas

A) Quimioluminiscencia

Se basa en la reacción de las especies reactivas con un compuesto marcado para producir un estado excitado de las especies, que emiten luz inducida químicamente (Prior et al. 2005). Este tipo de metodología aplicada se conoce como quimioluminiscencia mejorada (Fedorova et al. 2007).

El marcador más empleado es el luminol, aunque también se emplean lucegenin y proteínas bioluminiscentes como Pholasin (Karadag et al. 2009). La capacidad antioxidante se mide por fase de latencia.

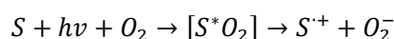
La emisión de luz es dependiente del flujo de radicales libres y la adición de los antioxidantes conduce a la extinción de la luz, durante la fase de latencia (Waring et al. 2003), expresando el resultado como porcentaje de inhibición (Karadag et al. 2009).

La principal ventaja de este método es que cambiando la especie reactiva inicial, detectamos la capacidad antioxidante sobre esa especie reactiva. La desventaja se encuentra en lo poco conocido que resulta el mecanismo y que la intensidad de luminiscencia varía considerablemente de unas emisiones a otras (Karadag et al. 2009).

♦ **Fotoquimioluminiscencia. *Phochemiluminescence Assay (PCL)***

Se diferencia de los otros métodos empleados de evaluación de la capacidad antioxidante, porque no necesita agentes oxidantes para la generación de radicales libres (Vertuani et al. 2004).

Los radicales libres son generados por la excitación óptica de un fotosensibilizador (S) generándose anión superóxido (Vertuani et al. 2004; Netzle et al, 2007).



Reacción 3.4: Generación fotoquímica de las especies reactivas (Vertuani et al. 2004)

La detección se realiza mediante quimioluminiscencia. El luminol actúa como fotosensibilizador, en la generación de radicales superóxido (Besco et al. 2007), y también como sonda (Popov y Lewin, 1996).

Este ensayo descrito anteriormente, se ha desarrollado en un kit comercial denominado *Photochem*, donde se miden capacidad antioxidante hidrófila (ACW) y capacidad antioxidante lipófila (ACL) (Besco et al. 2007). En los ensayos ACW se cuantifica la fase latencia y los resultados se expresan en referencia al trolox (Barba et al. 2013).

En cambio, en los ensayos de ACL la curva cinética de emisión de luz no presenta fase de latencia. Para realizar la medida se calcula la integral de la curva de emisión de luz (monitorizada durante 2 minutos), en presencia de antioxidantes y sin ellos, y los resultados se expresan en porcentaje de inhibición (Barba et al. 2013; Popov y Lewin, 1996).

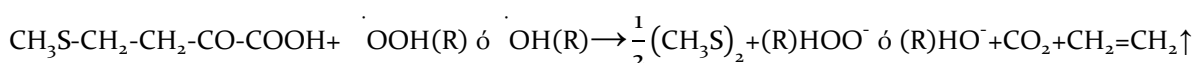
El ensayo PCL, es fácil y rápido de realizar, aunque es menos fiable con sustratos lipófilos, presenta numerosas ventajas: no requiere de altas temperaturas para generar radicales y es más sensible para medir, en pocos minutos, la actividad de barrido de antioxidantes contra el radical superóxido (Besco et al. 2007).

Una de sus mayores ventajas es que no requiere el control de pH, y de sus desventajas es que sólo se puede medir de una en una (Prior et al. 2005).

B) *Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC)*

Se basa en la formación de etileno debido a la oxidación sufrida por ácido α -ceto- γ -metiolbutírico (KMBA) por los radicales peroxilo, hidroxilo y peroxinitrilo. La capacidad antioxidante se evalúa mediante la inhibición de la producción de etileno de las tres ROS (Winston et al. 1998). Los radicales peroxilo fueron generados por descomposición térmica de AAPH.

La reacción de oxidación de KMBA se produce según el siguiente esquema:



Reacción 3.5: Oxidación del ácido KMBA por parte de distintas especies reactivas, tomado de Winston et al. (1998)

Las especies reactivas se generan de distintas formas, el peroxilo por la descomposición térmica de un azo iniciador como el AAPH, el hidroxilo mediante una reacción tipo Fenton (por ejemplo, Fe^{2+} /ascorbato), y el peroxinitrilo por la descomposición del SIN-1(3-morfolinosindnomina-N-carbamida) (Regoli y Winston, 1999; Lichtenthäler y Marx, 2005).

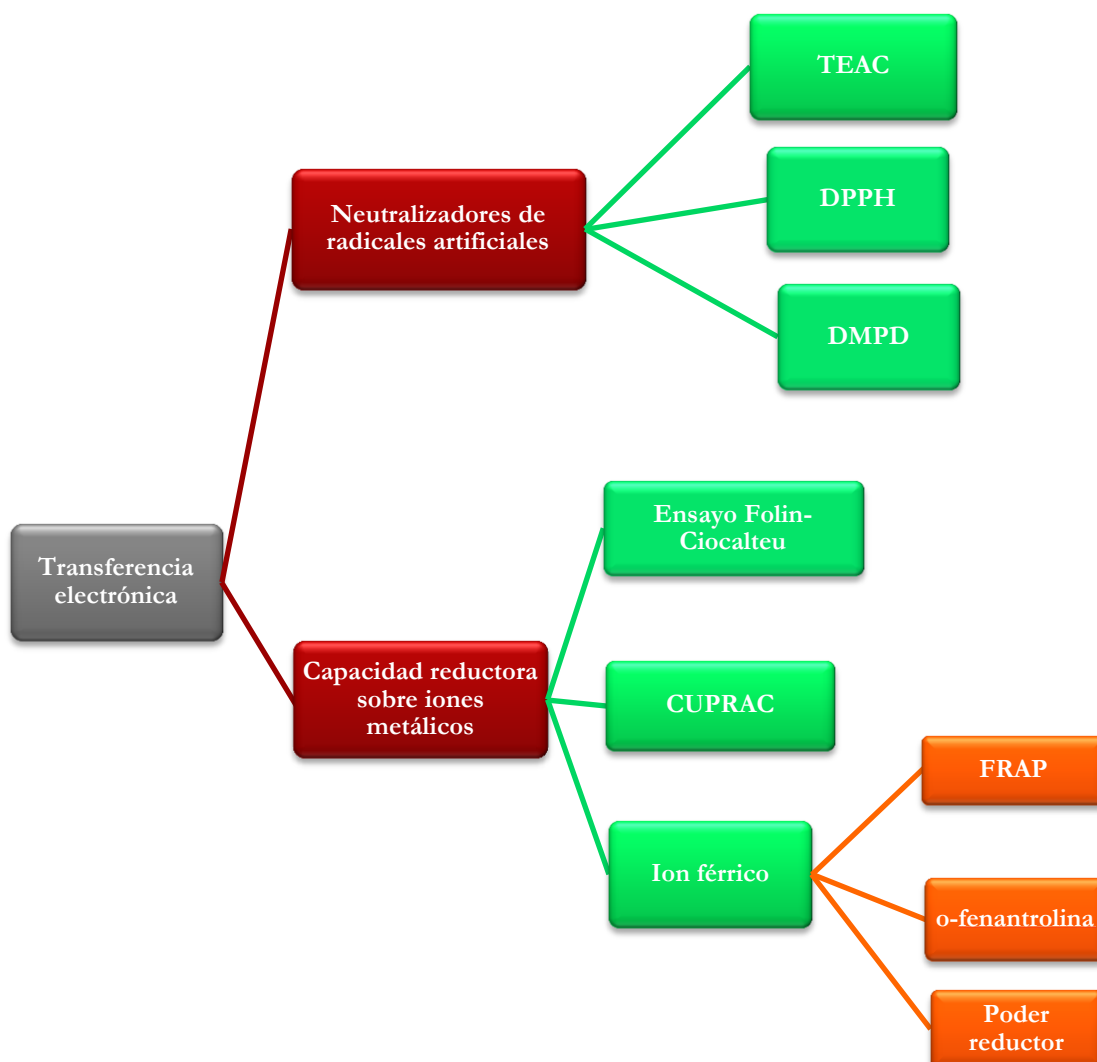
Se monitoriza el tiempo de formación del etileno por cromatografía gaseosa por espacio de cabeza. La cuantificación se basa en el área encerrada bajo la curva que define la inhibición de la formación del etileno en función del tiempo, que puede ser mayor de 300 minutos (Karadag et al. 2009). Así la capacidad antioxidante se obtiene de la relación entre la formación completa de etileno, sin antioxidantes añadidos, y con la adición de antioxidantes (Marx et al. 2005).

La principal ventaja es su eficacia a la hora de detectar antioxidantes hidrófilos y lipófilos, y su capacidad para distinguir la actuación rápida o lenta de los antioxidantes. Otra ventaja es que permite la cuantificación de tres especies reactivas. Una de sus mayores desventajas es el tiempo de ensayo, además de la inestabilidad de las disoluciones. No es adaptable a rutina ya que requiere múltiples inyecciones y múltiples diluciones (Prior et al. 2005; Karadag et al. 2009).

3.2. MECANISMOS DE TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA

Los métodos con transferencia electrónica se clasifican a su vez en función de su aproximación química según el esquema 3.3.

Esquema 3.3: Clasificación de los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante con mecanismo de transferencia electrónica



3.2.1. Neutralización de radicales artificiales

A) *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC)

Se trata de un método indirecto, no competitivo y presenta un mecanismo de transferencia electrónica, favorecido éste por el pH ácido (Prior et al. 2005).

Es uno de los métodos más empleados, se emplea ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) que es un sustrato tipo peroxidasa, que al ser oxidado por radicales peroxilo u otros oxidantes, genera un radical metaestable que es intensamente coloreado (Karadag et al. 2009), el cual presenta varios máximos de absorbancia a varias longitudes de onda 415, 645, 734, and 815 nm (Prior et al. 2005). La acción de los antioxidantes provoca la reducción del catión radical (provocando su decoloración), midiéndose el decaimiento de la absorbancia frente a la absorbancia inicial del catión.

Existen varias versiones de este método que varían sobre todo en la generación del catión radical, en la longitud de onda de la medida y en el orden en el cual se ponen los reactivos.

En la primera versión se empleaba metilmioglobina en presencia de H_2O_2 , con este tipo de oxidación la adición de los antioxidantes es previa a la obtención del catión radical, estos antioxidantes podían interferir en la generación del radical (Magalhaes et al. 2008).

En la segunda versión la generación del radical se llevaba a cabo por dióxido de manganeso en exceso y se emplea tampón salino fosfato (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) como disolvente (Schlesier et al. 2002).

En la última versión y más empleada, la generación del catión radical $ABTS^{++}$ con persulfato potásico requiere un tiempo largo, hasta 16 h, y una dilución posterior ajustando la absorbancia inicial del catión a $0,700 \pm 0,020$, en la cual se puede emplear PBS o etanol (Schlesier et al. 2002), actualmente es la generación del radical más empleada.

Los tiempos de reacción de 1 a 30 minutos se han adoptado a lo largo de los protocolos descritos en la literatura, debido principalmente a que a pH 7,4 requiere tiempos mayores de 10 minutos para reaccionar (Karadag et al. 2009). La absorbancia se mide a 734 nm ya que a longitudes de onda largas se minimizan las interferencias por la absorción de componentes de la muestra (Magalhaes et al. 2008).

Una de su mayores ventajas es que el $\text{ABTS}^{\cdot+}$ es soluble en agua y en disolventes orgánicos lo que le permite detectar antioxidantes hidrófilos y lipófilos (Karadag et al. 2009). Se puede utilizar en la ordenación de antioxidantes, además es simple, sencillo y automatizable (Prior et al. 2005).

Uno de sus mayores inconvenientes es su potencial de electrodo de 0,68 V, lo que permite que muchos compuestos puedan reducir el catión radical (Magalhaes et al. 2008), otro inconveniente es que el $\text{ABTS}^{\cdot+}$ es un catión que se degrada lentamente en las condiciones experimentales (Stratil et al. 2006). Además no está claro el valor de TEAC en relación con el número de electrones transferidos (Prior et al. 2005).

B) *2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl* (DPPH)

En este ensayo, el cromógeno púrpura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^{\cdot}) se reduce con un antioxidante al amarillo pálido correspondiente a la hidrazina. La capacidad de neutralización se mide generalmente en medio orgánico mediante el control del decaimiento de la absorbancia a longitudes de onda comprendidas entre 515-528 nm hasta que la absorbancia permanece constante o por resonancia de spin electrónico (Magalhaes et al. 2008). Por norma general los resultados se expresan en porcentaje de inhibición (Seeram et al. 2008) o referidos al trolox, como μmol de trolox equivalente/100 g (Moon y Shibamoto, 2009).

En general, los resultados se expresan como la concentración eficaz (EC_{50}), que es la concentración de antioxidantes necesaria para disminuir en un 50 % la concentración inicial de $\text{DPPH}^{\cdot+}$ (Morales et al. 2012). Se mide la eficiencia antioxidante a temperatura ambiente ya que elimina riesgos de degradación térmica de las moléculas analizadas. El mecanismo de reacción entre el antioxidante y el $\text{DPPH}^{\cdot+}$ depende de la estructura conformacional del antioxidante (Bondet et al. 1997).

La accesibilidad estérica de DPPH^{\cdot} radical (figura 3.1) es un importante factor determinante de la reacción, ya que pequeñas moléculas que tienen un mejor acceso al sitio radical, tienen una capacidad antioxidante relativamente más alta (Magalhaes et al. 2008).

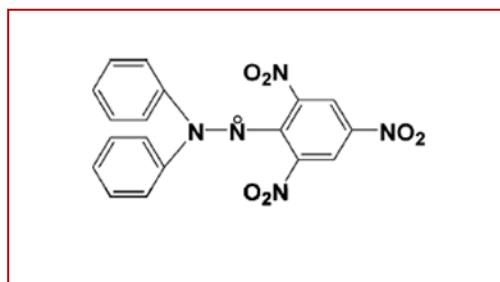


Figura 3.1: Estructura química del catión radical DPPH⁺. Adaptado de Huang et al. (2005)

La interpretación se complica cuando los compuestos del ensayo tienen un espectro que se superpone al del DPPH a 515 nm. Los carotenoides, en particular, interfieren (Prior et al. 2005). Además la monitorización del DPPH⁺ es una reacción lenta que puede tardar 20 minutos hasta 6 horas (Magalhaes et al. 2008).

El ensayo es técnicamente sencillo y rápido y sólo necesita un espectrofotómetro UV-Visible que podrían explicar su amplio uso en la detección de antioxidantes. Los análisis de un gran número de muestras puede hacerse mediante el uso de microplaca (Karadag et al. 2009).

C) *N,N*-Dimethyl-*p*-Phenylenediamine Dihydrochloride (DMPD)

Se basa en la generación de un radical que se genera por oxidación de diclorhidrato de N, N-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD) con cloruro férrico, en medio ácido, que es estable a los diez minutos. Este catión presenta un máximo de absorbancia a 505 nm. Al añadirle los antioxidantes, éstos son capaces de donarle un protón lo que provoca una inhibición de la absorbancia (Fogliano et al. 1999).

El mecanismo que presenta este método una vez estudiado es de transferencia electrónica (Huang et al. 2005) y no de transferencia de hidrógeno, como se planteó en un principio, al igual que el TEAC.

Se mide la absorbancia a 505 nm en cubeta de plástico y se mide la inhibición de la absorbancia, expresándolo en referencia al trolox (Fogliano et al. 1999).

En zumos de frutas fueron observados valores muy elevados en comparación con los otros métodos empleados para la evaluación de la capacidad antioxidante de zumos, por Pernice et al. (2002) y Gil et al. (2000).

Para encontrar una posible explicación Gil et al, (2000) fragmentaron las muestras, concretamente zumo de granada, mediante columnas de intercambio iónico y obtuvieron que la fracción acuosa donde se encontraban los ácidos orgánicos que presentaba mayor capacidad antioxidante con respecto a este método y no con los otros métodos utilizados (FRAP y DPPH). Además mediante otro ensayo determinaron que el ácido málico y el ácido tartárico eran capaces de neutralizar al $\text{DMPD}^{\bullet+}$, pero en mucha menor medida que el ácido cítrico.

Pernice et al, (2009), indicaron que como el método reflejaba la capacidad de neutralizar hidrógeno donadores, ya que éste es el mecanismo químico que se pensó que el método tenía en un principio, les indujo a pensar que el ácido cítrico le podía donar un átomo de hidrógeno produciendo su reducción

Otra explicación posible podría deberse al hecho de que el ácido cítrico es un buen quelador de metales y debido a la presencia de ion ferroso en la solución de catión radical, el ácido cítrico podría haberlo retenido, provocando que el equilibrio con el ion férrico/ferroso se desplazase hacia la formación de este último, lo que pudiese haber provocado la inhibición del catión radical (Decker, 2002).

Se ha propuesto una modificación empleando persulfato potásico como oxidante para obtener el catión radical ya que la presencia de metales en las muestras de vegetales puede contribuir a la oxidación de DMPD y, por lo tanto, causar una desviación negativa de los valores reales antioxidante. La presencia de Fe (II) y otros metales en las frutas y las muestras de vegetales puede aumentar la producción de las ROS a través de una reacción tipo Fenton, además la estabilidad del $\text{DMPD}^{\bullet+}$ también podría ser cuestionada en vista de la vulnerabilidad de la solución de hierro que se utiliza para la generación del catión radical por oxidación del aire (Asghar et al. 2007).

3.2.2. Capacidad reductora frente a iones metálicos

A) Evaluación de polifenoles totales por el reactivo Folin-Ciocalteu

El ensayo de Folin-Ciocalteu (Folin) es uno de los más antiguos métodos diseñados para determinar el contenido total de fenoles. El sistema de ensayo es una mezcla de tungstato y molibdato en un medio altamente básico (5-10 % Na_2CO_3).

Los fenoles son energéticamente oxidados en medio básico, resultando la formación del anión superóxido que a su vez, reacciona con el molibdato con la formación de óxido de molibdeno, MoO^{4+} que tiene una absorbancia muy intensa cerca de 750 nm (Roginsky y Lissi, 2005). Se emplea ácido gálico como referencia.

La ventaja del ensayo de Folin frente al TEAC es que el primero se asocia con la aparición de la absorbancia en lugar de con la disminución de absorbancia (Roginsky y Lissi, 2005). Sin embargo, el reactivo Folin-Ciocalteu no es específico de los polifenoles. También puede reducirse con otras sustancias como el ácido ascórbico, azúcares, ion cúprico, de hecho los fenoles reaccionan sólo en medio básico (Huang et al. 2005). Correlaciona bien con métodos que presentan un mecanismo transferencia de átomo de hidrógeno como el ORAC, lo que confirma el valor, la utilidad de Folin-Ciocalteu para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras de alimentos (Magalhaes et al. 2008).

Una de las principales ventajas del método es que su procedimiento está bastante estandarizado, y su absorción a una longitud de onda larga minimiza las interferencias producidas por la matriz alimentaria. Su principal desventaja es que no es aplicable en entornos lipófilos (Gülçin, 2012).

Huang et al. (2005), sugirieron un cambio en el nombre de este ensayo por **“capacidad reductora por el reactivo de Folin-Ciocalteu”**, u otro nombre propuesto por Brenna et al (2008) **"Sustancias reductoras totales"**.

B) *Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)*

Está basado en la reducción del ion cúprico a cuproso a complejados por la neocuproína (Nc) (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) que produce un complejo con el ion cuproso de intenso color amarillo. Las reacciones de oxidación podían considerarse completas en 30 minutos (Apak et al. 2008). Se desarrolla a pH neutro (Karadag et al. 2009) lo que le asemeja más al fisiológico, 7,4 (Gülçin, 2012). Se expresa en equivalentes de trolox por gramo o por litro de muestra (Apak et al. 2004).

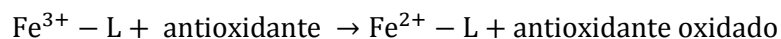
En esta reacción, los grupos reactivos Ar-OH de los antioxidantes polifenólicos se oxidan a las quinonas correspondientes (ácido ascórbico se oxida a ácido dehidroascórbico) y Cu (II)-Nc se reduce a Cu (I)-Nc mostrando un quelato con un máximo de absorbancia a una longitud de onda 450 nm (Apak et al. 2008).

El cobre, libre y en los complejos fenantrolina, tiene un potencial redox menor que el hierro, por lo que sus reacciones son más selectivas; azúcares y ácido cítrico, que actúan como interferentes en el ensayo FRAP, no se oxidan con el reactivo empleado en este ensayo (Apak et al. 2004; Prior et al 2005; Gülçin, 2012).

Además de este método, existen otros dos métodos más basados en la reducción del ion cúprico a cuproso, acomplejados por dos ligandos derivados de la fenantrolina que son la batocuproína (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina) en el método PAO (Da Cruz, 2003) y la disulfonato de batocuproína disódica en el CUPRAC-BCS, desarrollado por Campos et al. (2009).

C) Métodos basados en la reducción del ion férrico

Son métodos indirectos y no competitivos que poseen un mecanismo transferencia electrónica. Todos estos métodos presentan el siguiente esquema de reacción, donde L es un ligando selectivo que forma un complejo coloreado con Fe^{2+} (Berker et al. 2007).



Reacción 3.6: Esquema de la reacción transcurrida en los métodos basados en la reducción del ion férrico, adaptado de Berker et al. (2007)

♦ *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)*

El ensayo se basa en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido. Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 593 nm durante 4 minutos, los resultados se expresan con referencia al trolox como $\mu\text{mol TE/g}$ o $\mu\text{mol TE/l}$ (Benzie y Strain, 1996).

Pulido et al. (2003) aumentaron ese tiempo de reacción a treinta minutos ya que para moléculas de mayor tamaño, como los polifenoles, requieren tiempos mayores de reacción.

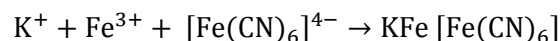
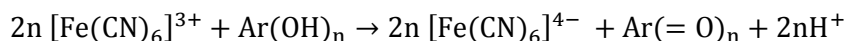
Se desarrolla en medio ácido a pH 3,6 que es demasiado bajo en comparación con el fisiológico (Magalhaes et al. 2008). Su potencial de electrodo es de 0,77 v lo que implica que muchos compuestos no antioxidantes podrían reducirlo (Prior et al. 2005).

El ensayo FRAP mide la capacidad antioxidante basada en la capacidad de reducción del ion férrico, por tanto, los antioxidantes que actúan como neutralizadores de radicales (de transferencia hidrógeno), en particular tioles y los carotenoides, no se determinan (Magalhaes et al. 2008).

El ensayo FRAP es simple, barato y puede ofrecer un índice putativo de la capacidad antioxidante (Prior et al. 2005).

♦ Poder reductor

Se basa en la reducción por parte de los antioxidantes del ferricianuro a su forma reducida obteniéndose el complejo coloreado (azul Prusia). Es necesario estabilizar el ferrocianuro con iones férricos (Berker et al. 2010).



Reacción 3.7: Formación del azul Prusia, adaptado de Berker et al. (2010).

Se mide su absorbancia a 700 nm, lo que constituye una ventaja importante en la selección del método espectrofotométrico, porque esta longitud de onda está alejada de los máximos a los que absorben compuestos que se encuentran en los alimentos (Berker et al. 2007).

Una de sus mayores desventajas es que precipita rápidamente con algunos antioxidantes como es el caso del trolox (dos minutos después de añadir el cloruro férrico que estabiliza el azul Prusia), lo que requiere una rápida medida y al ser necesaria una incubación no debe usarse ácido ascórbico como estándar (Berker et al. 2010).

Existe una modificación a este método desarrollada por Berker et al. (2007), que consiste en añadirle un estabilizador, para evitar la precipitación y un pH más adecuado para el ion ferroso, que minimiza esta desventaja, o también puede evitarse mediante la automatización del ensayo.

♦ **O-Fenantrolina**

Se basa en la reducción del complejo formado por Fe^{3+} con 1,10-fenantrolina por parte de los antioxidantes a un complejo de Fe^{2+} . Después de 20 minutos de oscuridad se mide la absorbancia a 510 nm (Szydłowska-Czerniak et al. 2008).

El ligando fenantrolina y el Fe (III) forma un quelato de 1:3, por este motivo el potencial redox se desplaza a valores más altos (1,6 V), debido a la estabilización selectiva de iones ferrosos con este ligando. Además de que su número de coordinación está saturado, proporcionando al complejo ferroso una mayor estabilidad (Berker et al. 2007).

Basado en este método se ha desarrollado un kit, por el instituto Nanjing Jiancheng Bioengineering, (China), el cual está especialmente preparado para su uso en fluidos biológicos.

3.3. NEUTRALIZADORES DE OTRAS ESPECIES REACTIVAS

Además de los radicales peroxilo, que son los más ampliamente estudiados en los ensayos descritos anteriormente es necesario analizar la capacidad de los antioxidantes para proteger del daño oxidativo de otros oxidantes como los radicales hidroxilo, ácido hipocloroso, peroxinitrito o moléculas oxidantes como el peróxido de hidrógeno.

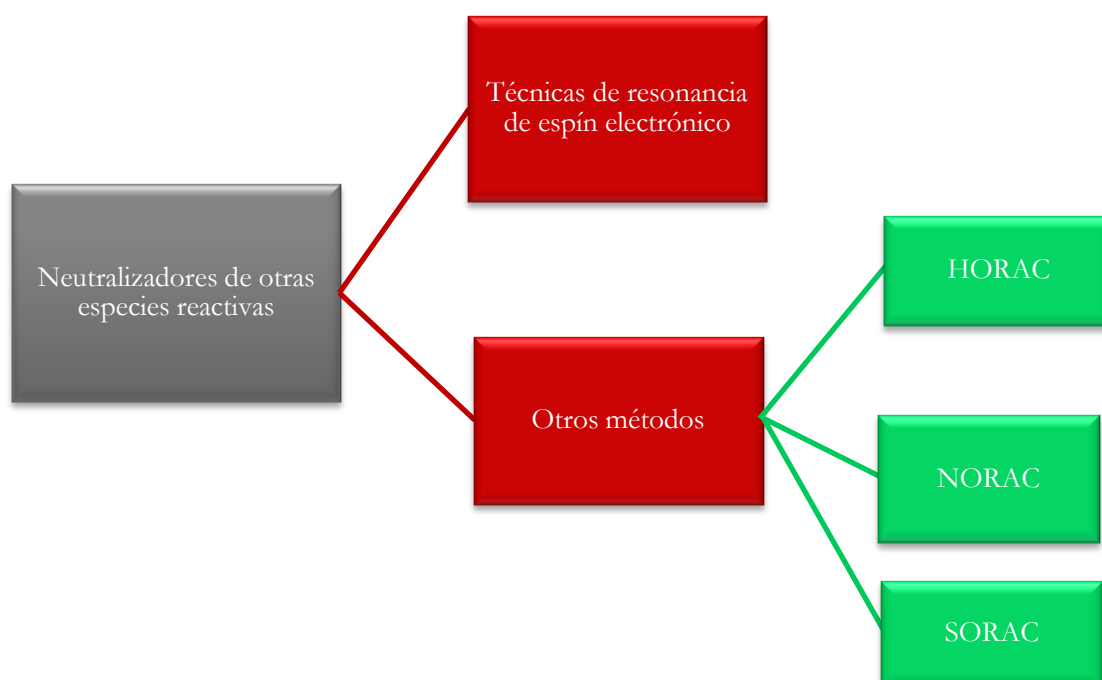
Para evaluar la capacidad antioxidante en relación a estas especies reactivas se han empleado distintos métodos, enzimáticos, espectrofotométricos, fluorimétricos y unos de los más empleados, para los radicales libres, son los que se basan en la resonancia de espín electrónico (RSE). Este método involucra la detección específica de radicales (Antolovich et al. 2002).

Algunos de los ensayos empleados para la neutralización de las distintas especies reactivas que se describen a continuación consisten en la inhibición de los ensayos utilizados específicos para detectar las especies reactivas.

En estos métodos hay dos aproximaciones distintas, la primera involucra la generación de una especie reactiva y se mide directamente la inhibición por parte de los antioxidantes, otra manera es que la generación de esta especie reactiva va acoplada a la oxidación de un sustrato, que se inhibe por la presencia de antioxidantes (Antolovich et al. 2002).

Dentro de estos métodos podemos distinguir aquellos que se derivan de técnicas de espín electrónico y otros métodos que en estos últimos años evalúan la capacidad antioxidante sobre otras especies reactivas (esquema 3.4).

Esquema 3.4: Clasificación de los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante de otras especies reactivas



3.3.1. Técnicas de Resonancia de Espín Electrónico

Uno de los procedimientos instrumentales más extendidos para la evaluación de la neutralización de las especies reactivas es la espectroscopia de resonancia de espín electrónico.

Debido a que la vida media de los radicales libres no es muy alta, se usa una técnica para ampliarla que se denomina atrapamiento de espín (Antolovich et al. 2002), cuya función es alargar la vida media de estos radicales, lo que permite su detección.

Las principales trampas espín son compuestos nitroso y nitronas (Buettner y Mason, 1990), que reaccionan con el radical libre bajo estudio, formando un aducto, generalmente nitróxido (Buettner, 1987), que es un radical más estable que puede ser detectado por espectroscopia de resonancia de espín electrónico (Khan et al. 2003).

Una de las trampas espín más empleadas es 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) aplicado para evaluar los captadores de HO^\bullet . En este caso, los compuestos antioxidantes inhiben la formación de aductos DMPO-OH (Magalhaes et al. 2008).

En este ensayo la capacidad antioxidante se mide por la competencia entre los antioxidantes y la trampa de espín (DMPO) para eliminar el radical hidroxilo. La capacidad se expresa por la concentración del extracto para reducir la altura de la señal DMPO en un 50 % (Schwarz et al. 2001).

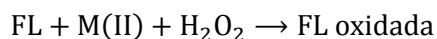
Con esta misma trampa de espín también se determinó el anión superóxido formando el aducto DMPO-OOH, que presenta una gran desventaja ya que puede descomponerse en DMPO-OH. Empleando otro trampa 5-etoxicarbonilo-5-metil-pirrolina-N-óxido (empo) no se descompone el aducto empo-OOH (Karadag et al. 2009).

3.3.2. Otros Métodos

Dentro de los métodos desarrollados para la neutralización de las distintas especies reactivas en los últimos años, los más empleados en la evaluación de la neutralización de otras especies reactivas son el HORAC, NORAC, SORAC, que han sido adaptados a microplaca de 96 pocillos y todos ellos emplean la fluorimetría como método de detección. Con estos métodos se ha evaluado la capacidad antioxidante, en cereza ácida por Ou et al. (2012), en café por Mullen et al. (2011), vegetales por Číž, et al. (2010), en setas por Dubost et al. (2007) y en acai por Schauss et al. (2006).

A) *Hydroxyl (HO) Radicals Averting Capacity (HORAC)*

Emplea fluoresceína (FL) como diana (Huang et al. 2005). Para la generación de los radicales OH^\bullet se usa Co (II) mediante una reacción tipo Fenton. La formación de radicales hidroxilo en las condiciones experimentales es confirmada indirectamente por la hidroxilación del ácido *p*-hidroxibenzoico.



Reacción 3.8: Oxidación de la fluoresceína por reacción tipo Fenton. Adaptado de Ou et al. (2002)

En presencia del antioxidante (L), la formación de radicales hidroxilo puede ser inhibida, porque el metal está desactivado debido a una posible coordinación con antioxidantes (Ou et al. 2002). La curva de decaimiento de la fluorescencia de FL se monitoriza en la ausencia o presencia de antioxidantes, el área bajo la curva de caída de fluorescencia (AUC) se integra, y la AUC neta se calcula restando las AUC del blanco de la de los antioxidantes de la muestra. El método de cuantificación es el mismo que para el ensayo ORAC, excepto porque es el ácido gálico el que se utiliza como estándar. En este método han sido validadas su linealidad, precisión, exactitud y robustez. Pueden analizarse una amplia gama de antioxidantes fenólicos. La capacidad de prevención del radical hidroxilo se debe principalmente a su capacidad quelante de metales (Huang et al. 2005).

B) *Peroxynitrite Scavenging Capacity (NORAC)*

Consiste en un ensayo fluorimétrico que emplea como diana la dihidrorodamina 123, que reaccionan específicamente con el peroxinitrito obteniéndose un producto de oxidación altamente fluorescente, la rodamina 123 (Crow, 1997).

El peroxinitrito se genera por la descomposición de SIN-1, midiéndose en microplaca con una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 530 nm, los antioxidantes inhibirán la reacción produciéndose la disminución de la fluorescencia (Chung et al. 2001).

C) *Superoxide Radical Absorbance Capacity (SORAC)*

Se emplea hidroetidio como diana, que es un compuesto no fluorescente, que es oxidado por el $\text{O}_2^{\bullet-}$ (generados a partir de la mezcla xantina oxidasa y xantina) produciéndose etidio que es un compuesto fluorescente (Gomes et al. 2005), con una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 567 nm, los antioxidantes provocan la inhibición de la oxidación del hidroetidio, lo que produce una disminución de la fluorescencia. Se emplea superóxido dismutasa (SOD) como referencia y se expresa el resultado en SOD equivalentes por gramos o por litros (Zhang et al. 2009).

Objetivos

Y

Plan de trabajo

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la evaluación de compuestos bioactivos de diferente naturaleza en dos tipos de bebidas no alcohólicas, café soluble y zumos, que se comercializan en España en la actualidad, con el fin de relacionar su presencia con la actividad biológica (antioxidante) determinada, por diferentes métodos, en cada una de las bebidas estudiadas.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación de los compuestos bioactivos presentes en las bebidas no alcohólicas seleccionadas en este trabajo: cafés y zumos de fruta.
- Selección y puesta a punto de los métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*, teniendo en cuenta la adecuación de los ensayos realizados a las muestras objeto de estudio, bebidas no alcohólicas.
- Evaluar la capacidad antioxidante de bebidas no alcohólicas (café y zumos) con diferentes métodos de medida.
- Estudiar la bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos bioactivos del café soluble para determinar su potencial efecto antioxidante sobre el organismo, tras la ingestión de la bebida.
- Comparar las bebidas que presentan alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en su etiquetado con aquellas que no lo hacen.

5. PLAN DE TRABAJO

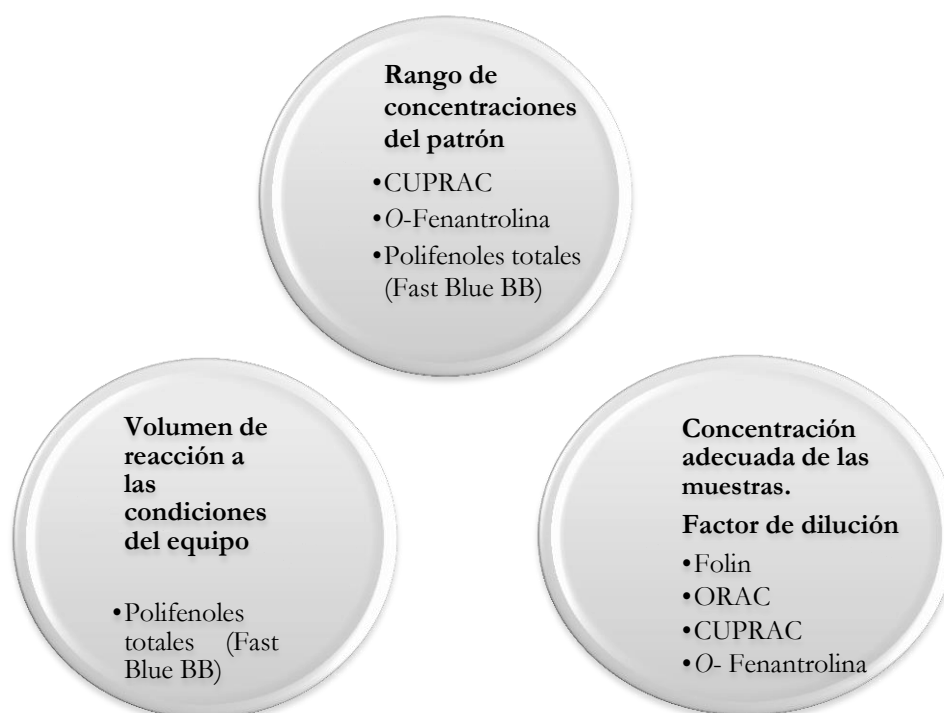
Los compuesto bioactivos evaluados fueron ácidos orgánicos, vitamina C, familias polifenólicas, (ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavanoles y antocianinas), y polifenoles totales. Para determinar los polifenoles totales, se adaptó a un espectrofotómetro convencional el nuevo método para determinar el contenido de polifenoles totales, denominado Fast Blue BB.

Para evaluar la capacidad antioxidante fue necesario seleccionar los métodos para determinarla y éstos debían ser adecuados para las muestras bajo estudio. Debido a la gran cantidad de métodos desarrollados en los últimos años, la selección tuvo en cuenta el tipo de muestras, todas ellas son bebidas no alcohólicas, cuyo componente principal es el agua, por lo tanto, los métodos más adecuados para su evaluación eran de carácter hidrófilo.

Una vez seleccionados los métodos adecuados para las bebidas no alcohólicas se debieron modificar alguno de los puntos de sus procedimientos, como el rango de concentraciones de los estándares empleados, la cantidad de muestra en la reacción, así como la concentración de muestra adecuada (factor de dilución adecuado), y también en algunos casos fue necesario cambiar el volumen de la reacción para su adaptación al equipo y a las características de las muestras. Todas las modificaciones realizadas a los métodos están recogidas en el esquema 5.1.

Además de estas modificaciones recogidas en el esquema 5.1, en las familias polifenólicas se simultanearon dos ensayos, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, ya que el procedimiento de los ensayos originales evaluaba las muestras de la misma manera, lo que permitió simultanearlos.

Esquema 5.1: Modificaciones producidas en la adaptación de cada uno de los métodos de capacidad antioxidante y polifenoles totales



En las muestras evaluadas en el presente trabajo, se fueron realizando estas modificaciones de los ensayos y además se realizaron otras determinaciones para caracterizar las muestras, en las cuales se aplicó el procedimiento descrito por quien desarrolló el método empleado. La tabla 5.1 resume las determinaciones realizadas en el presente trabajo para cada tipo de bebidas analizadas.

El desarrollo experimental del presente trabajo se realizó mayoritariamente en el Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología, de la Facultad de Farmacia de la UCM, en el marco del grupo de investigación ALIMNOVA (UCM-GR35/10A). Las determinaciones analíticas correspondientes al método ORAC se realizaron en el Departamento de Bioactividad y Análisis en el instituto en Ciencias de la alimentación (CIAL/CSIC UAM).

Tabla 5.1: Determinaciones realizadas a cada bebida

Análisis	Tipo de Bebidas	
	Café Soluble	Zumos
Parámetros Fisicoquímicos		
°Brix		✓
pH		✓
Acidez Titulable		✓
Compuestos bioactivos		
Vitamina C		✓
Ácidos Orgánicos	✓	✓
Polifenoles Totales	✓	✓
Familias polifenólicas		
Ácidos hidroxibenzoicos		✓
Ácidos hidroxicinámicos	✓	✓
Flavonoles	✓	✓
Antocianidinas Totales		✓
% Color polimérico		✓
Capacidad Antioxidante		
ORAC		✓
TEAC	✓	✓
FOLIN	✓	✓
CUPRAC	✓	✓
FRAP	✓	✓
O-Fenantrolina	✓	
Bioaccesibilidad de compuestos bioactivos		
Bioaccesibilidad	✓	

Metodología

6. MÉTODOS ANALÍTICOS

6.1. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

6.1.1. pH

Se determinó por medida potenciométrica realizada a 20 °C en pHmetro, Micro pH 2000 CRISON.

6.1.2. °Brix

Medida refractométrica en el refractómetro Atago a 20° C de temperatura y los resultados se expresan como °Brix (porcentaje de sacarosa medido a 20°C) (m. 932.14C AOAC; Latimer 2012).

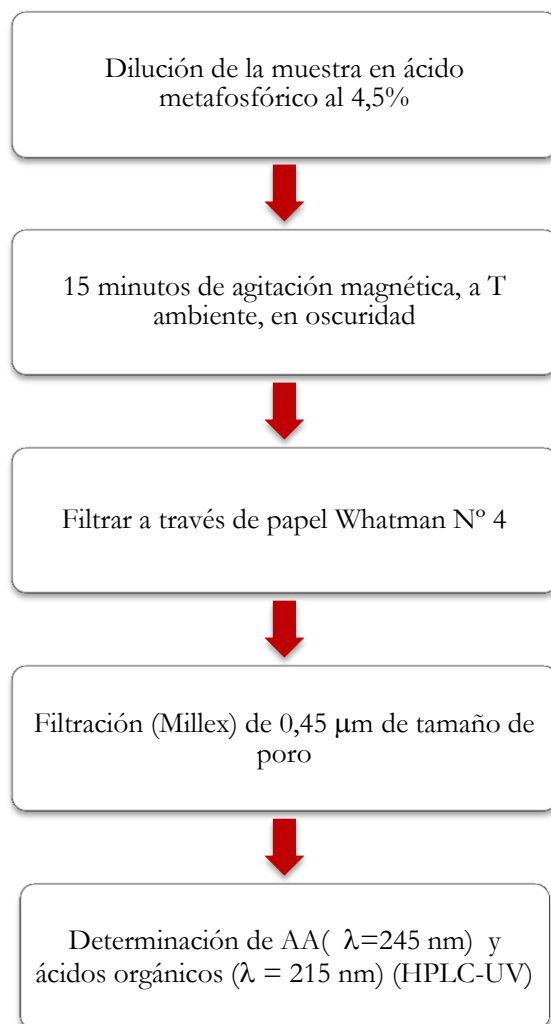
6.1.3. Acidez titulable:

Se valoró la acidez debida a los ácidos presentes en la muestra por volumetría ácido-base (942.15-AOA. C, Latimer, 2012). Se llevó a cabo en la muestra diluida al 10 %, con NaOH 0,1 N de factor conocido por medida potenciométrica hasta pH 8,1. Los resultados se expresaron en g/l de ácido cítrico.

6.2. VITAMINA C

Su cuantificación se realizó por cromatografía HPLC en fase reversa según el procedimiento descrito por Sánchez-Mata et al. (2012). La cuantificación se realizó utilizando un patrón de ácido ascórbico (Merck) partiendo de una concentración de 1 mg/ml en ácido metafosfórico al 4,5 %. Se realizó una curva de calibrado entre 1-9 µg/ml.

Esquema 6.1: Procedimiento de extracción de vitamina C (AA) y ácidos orgánicos



Condiciones cromatográficas y equipo:

- Fase móvil; agua acidificada (1,8 mM H₂SO₄) pH 2,6 a un flujo 0,9 ml/min empleado una bomba isocrática modelo Concept PU II (MSI).
- 100 µl patrón y 50 µl de muestra; en inyector automático (Waters 717 plus autosampler, Milford, MA, USA.).
- Columna: Spherclone ODS (2), 5 µm; 4,6 x 300 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA).
- Longitud de onda de 245 nm, detector: UV-visible detector (Thermo Separation Spectra Series UV 100).
- Software: Cromanec XP (Micronex, Spain).

6.3. ÁCIDOS ORGÁNICOS

La extracción de los ácidos orgánicos se realizó según el mismo procedimiento que para el ácido ascórbico, salvo que en lugar de enrasar a 25 ml con el ácido metafosfórico se empleó la fase móvil. Las condiciones cromatográficas varían con respecto a la determinación de ácido ascórbico, en un flujo de 0,4 ml/min y la longitud de onda de detección de 215 nm.

Como patrones se emplearon ácido oxálico dihidratado, ácido cítrico monohidratado, ácido málico, ácido quínico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido isocítrico, ácido gálico, y ácido siquímico (Sigma) y ácido tartárico (Panreac).

6.4. POLIFENOLES TOTALES

6.4.1. Fast Blue BB

Este método fue desarrollado por Medina (2011b). Se basa en la diazonización de los compuestos fenólicos, produciéndose una reacción específica entre los polifenoles presentes en las muestras y la sal Fast Blue BB que es una sal azo.

Se empleó el método descrito por Medina (2011a), con la modificación realizada por Maieyes et al. (2015) para adaptarlo a un espectrofotómetro convencional. El procedimiento se desarrolló de la siguiente manera; sobre 4 ml de disolución de patrón o muestra diluida, en tubos borosilicatados, se añadieron 0,4 ml de (4-benzoilamino-2,5-dietoxibencenodiazonio) cloro hemiclورو de zinc (Fast Blue BB) (Sigma) al 0,01 %, se agitó durante 1 minuto y se añadieron 0,4 ml de NaOH al 5 %, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos.

Antes de medir su absorbancia se volvió a agitar los tubos para homogeneizarlos y se midió su absorbancia a 420 nm en espectrofotómetro UV-visible, Lambda EZ 210 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA), frente a un blanco de reactivos. Como patrón se empleó ácido gálico en agua destilada en un rango de concentraciones entre 0-250 mg/l.

En el caso de las muestras, para evitar las posibles interferencias a esa longitud de onda con otros componentes de las bebidas es necesario realizar un blanco de las mismas, en el que a los 4 ml de la dilución de la muestra se le añaden 0,8 ml de agua, obteniéndose una absorbancia de blanco de muestra que debe restarse de la absorbancia obtenida por la muestra. Los resultados se expresaron en mg ácido gálico por litro de muestra.

6.5. FAMILIAS FENÓLICAS

6.5.1. Ácidos hidroxibenzoicos

El método se basa en el método de índice de fenoles empleado por Bonoli et al. (2004). Para realizarlo se empleó ácido fórmico (Merck) al 0,3 % como disolvente y ácido gálico como patrón en un rango de concentración de 0 a 29 mg/l. Para ello se pusieron en tubos de ensayo 4 –x ml de ácido fórmico y x ml de un patrón de gálico de 1000 mg/l, y se añadieron 0,5 ml de agua destilada. Se agitó mediante vortex y se midió frente a un blanco de reactivos a 280 nm.

6.5.2. Ácidos hidroxicinámicos-flavonoles

Estas estimaciones de familias polifenólicas se basan en los métodos de Bonoli et al. (2004), para el índice de hidroxicinámicos e índice de flavonoles. Para ambos métodos se empleó metanol (Lab Scan calidad ACS) como disolvente, y como estándar se emplearon respectivamente ácido ferúlico (Sigma) y quercetina (quercetina dihidratada, Fluka).

El procedimiento se realizó de la siguiente manera; en tubos de ensayo se añadieron 0,5 ml de agua, 4-x ml de MeOH y x ml de patrón de 500 mg/l de ácido ferúlico (Sigma) para los ácidos hidroxicinámicos y para el análisis de los flavonoles x ml de 900 mg/l de quercetina (para ambos x varió entre 0 a 0,130 ml). Se midió en cubetas de cuarzo simultáneamente a 320 nm y 350 nm (espectrofotómetro UV-visible, Lambda EZ 210), respectivamente, frente al blanco de reactivos.

6.5.3. Antocianinas monoméricas totales

Se realizó la medida por el método de la diferencia de pH (Giusti y Wrolstad, 2001), para ello se prepararon dos disoluciones salinas distintas una de KCl (Probus) 0,025M a pH 1.00 y una segunda de acetato sódico (Merck) 0,4 M a pH 4,50.

El pH de ambas disoluciones se ajustó con HCl comercial (Panreac). Ambas se emplearon como disolventes a los distintos pHs.

Para cada muestra previamente se determinó el factor de dilución apropiado disolviéndolo a pH 1,00. Para ello fue necesario tener en cuenta que la absorbancia a la longitud de onda máxima fuese inferior a 1,20 y que el factor de dilución no debía exceder el 20 %, ya que superaría el índice de saturación de ambas disoluciones. Una vez obtenido se procedió a realizar las diluciones de la muestra con el mismo factor de dilución (FD) en ambos disolventes.

La longitud de onda máxima depende del patrón elegido para cuantificar los resultados así para la antocianina cianidin-3-glucósido se midió a una longitud de onda de 510 nm (espectrofotómetro UV-visible, Lambda EZ 210). Para los cálculos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{mg cianidin-3-glucósido} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \frac{[(A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}] * \text{Mr} * \text{FD} * 1000}{\epsilon * \ell}$$

Ecuación 6.1: Ecuación para la obtención de la cantidad de antocianinas expresadas en mg cianidin-3-glucósido/l. Tomado de Giusti y Wrolstad, (2001)

Para este tipo de muestras se escogió cianidin-3-glucósido como patrón que tiene una masa molecular (Mr) de 449,2 g/mol y un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $26900 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, siendo ℓ la longitud de paso de luz.

6.5.4. Análisis del color polimérico de las antocianinas

Se realizó por el método descrito por Giusti y Wrolstad (2001) para el blanqueamiento de las antocianinas. Con el factor de dilución obtenido para la determinación de antocianinas monoméricas se realiza la misma dilución con agua destilada y de ésta se toman 2,8 ml y se les añade 0,2 ml de una disolución al 20 % de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Fluka) que se prepara diariamente disolviendo 1 g de piro sulfito potásico en 5 ml de agua destilada. Se deja reposar 15 minutos y se mide a 420, 510 y 700 nm (espectrofotómetro UV-visible, Lambda EZ 210) ambas diluciones, en agua destilada y a la dilución que se le añadió el agente blanqueante, es decir, la solución de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ antes mencionada.

Con estas absorbancias realizamos los cálculos para obtener el porcentaje de color polimérico.

$$\text{Densidad de color} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{510} - A_{700})]_{\text{Agua destilada}} * \text{FD}$$

$$\text{Color polimerico} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{510} - A_{700})]_{\text{Agua destilada} + \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5} * \text{FD}$$

$$\% \text{ color polimerico} = \frac{\text{color polimerico}}{\text{densidad de color}} * 100$$

Ecuación 6.2 Ecuaciones para calcular el color polimérico, tomado de Giusti y Wrolstad, (2001)

6.6. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

6.6.1. ORAC

Se realizó empleando el procedimiento desarrollado por Dávalos et al, (2004) y modificado por Hernández-Ledesma et al. (2005) a un volumen final de 200 µl, en microplaca (las placas empleadas fueron de poliestireno negro de 96 pocillos, Costar 96), el lector de placa empleado fue FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Germany).

En la microplaca, se añadieron 120 µl de fluoresceína 70 nM (Sigma), 20 µl de trolox (Sigma) con un rango de concentración comprendido entre 1 y 8 µM, más 60 µl de AAPH 14 µM (Sigma).

Como disolvente para todas las disoluciones, que se llevaron a cabo durante el ensayo, se empleó 75 mM a pH 7,4 de tampón salino fosfato (PBS), que se preparó a partir de 810 ml de una disolución de 13,06 g de K₂HPO₄ (Sigma), en 1 l H₂O Milli Q y 190 ml de 2,59 g de NaH₂PO₄ (Sigma) en 250 ml H₂O. Tanto el trolox como el AAPH se prepararon diariamente.

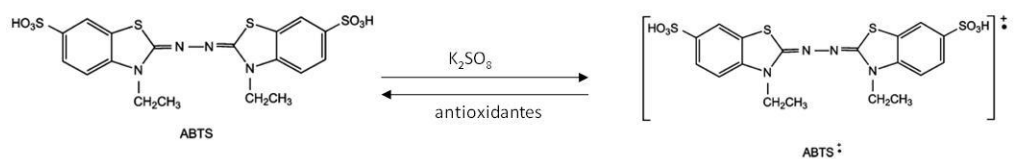
Una vez cargada la placa con la fluoresceína, el trolox y las muestras, se realizó una incubación, en el equipo, a 37°C, durante 10 minutos, mientras se preparaba el iniciador (AAPH), y una vez añadido se introducía en el lector, con una longitud de onda de excitación de 485 nm y emisión de 525 nm, durante 1 hora y 35 minutos. El software empleado para la recogida de datos fue Optima Control. Una vez terminado, se realizaron los cálculos determinando el área encerrada bajo la curva (AUC) de cada uno de los pocillos, y con ellas se calculó la recta de calibrado del trolox, concentración frente a AUC. Los resultados de las muestras se expresaron en mmol de trolox equivalente por litro de muestra.

6.6.2. TEAC

Se basa en la reducción por parte de los antioxidantes del catión radical $ABTS^{\bullet+}$, de todas la formas de generación del catión radical se escogió la propuesta por Re et al (1999), que se realizó a partir de la oxidación de 7 mM de Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) (Sigma) con 2,45 mM persulfato potásico (Fluka), en agua destilada, durante 16 horas, manteniéndolo en oscuridad y en nevera a 4°C.

Una vez obtenido el catión radical se realizó una dilución con PBS a pH 7,4 para llegar a una absorbancia del catión radical a 734 nm de $0,800 \pm 0,020$ (aproximadamente 1ml a 80 ml).

La dilución del radical $ABTS^{\bullet+}$ se trasladó a tubos de ensayo, 4 ml en cada tubo, que se protegieron de la luz lo máximo posible. Como estándar se empleó trolox y se realizó una curva de calibrado de $3,90 \cdot 10^{-3}$ - $1,75 \cdot 10^{-2}$ mM, diluido en metanol, con el siguiente procedimiento: en tubos de ensayo se añadieron a los 4 ml del catión radical se le añadieron 0,150 ml de agua destilada, 0,100-x ml MeOH, y x ml de trolox. Se mide el decaimiento de la decoloración a 734 nm (espectrofotómetro UV-visible, Lambda EZ 210), 30 minutos después de añadir el trolox, frente a PBS.



Reacción 6.1: Oxidación del ABTS con persulfato potásico y reducción del catión radical por parte de los antioxidantes. Tomado de Moon y Shibamoto, (2009)

Los resultados se calcularon en porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{Abs_0 - Abs_{\text{muestra}}}{Abs_0} * 100$$

Ecuación 6.3: Cálculos de porcentaje de inhibición del catión radical ABTS^{•+}

Los resultados de las muestras se expresaron en mmol de trolox equivalente por litro de muestra.

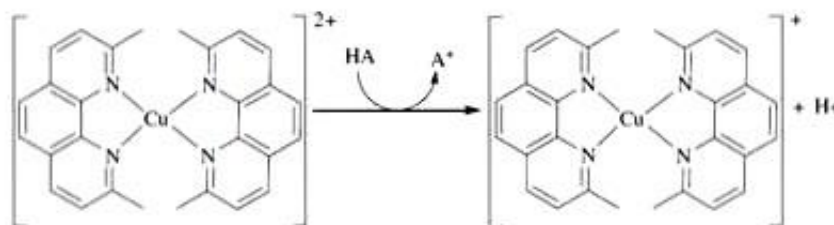
6.6.3. Sustancias reductoras totales (Folin)

Se basa en la reducción por parte de los antioxidantes del reactivo de Folin-Ciocalteu, en medio básico. Para ello se tomó como referencia el método de Singleton y Rossi, (1965) para la determinación de fenoles totales con la modificación propuesta por Brenna et al. (2008), para la determinación de sustancias reductoras totales. Para realizar el ensayo, se tomó 1 ml de patrón o muestra en dilución adecuada, a continuación se añadió 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar durante 5 minutos, a continuación se le añadió 4 ml de una disolución de carbonato sódico 100 mg/l y se enrasó con agua destilada a 25 ml. Se dejó reposar una hora y media en oscuridad, midiéndose su absorbancia a 750 nm (espectrofotómetro UV-visible, Lambda EZ 210) frente a un blanco de reactivos. Se empleó ácido gálico como estándar entre 0 y 240 mg/l y los resultados se expresaron como mg ácido gálico equivalente por litro de muestra.

6.6.4. CUPRAC

El ensayo se llevó a cabo según la metodología descrita por Apak et al. (2008). Se añadió a cada tubo de ensayo 1 ml de cloruro cúprico 10 mM (Merck), 1 ml de neocuproína (Sigma) 7,5 mM, y 1 ml de acetato amónico 1M (Sigma) (pH 7), formación del complejo $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$.

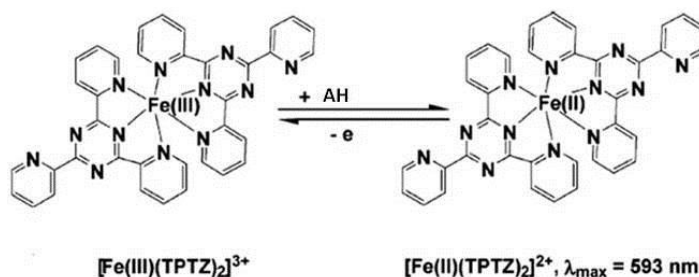
A continuación se añadieron x ml de trolox (0 a 1,1 ml) y 1,1-x ml de agua destilada. Se dejó desarrollar el color durante 30 minutos y se midió su absorbancia a 450 nm. Como estándar se empleó trolox en un rango de concentraciones entre 0 y 9×10^{-2} mM. Los resultados de las muestras se expresaron en mmol de trolox equivalente por litro de muestra.



Reacción 6.2: Reducción del complejo de neocuproína con ion cúprico al complejo correspondiente formado por neocuproína e ion cuproso, tomado de Gülçin (2012)

6.6.5. FRAP

Se empleó la versión del método modificado por Pulido et al. (2003). Se realizó primero la formación de tripiridiltriazina férrica, a partir de una tampón acetato 0,3 M a un pH de 3,60 (1,92 g de acetato potásico (Merck) y 15 ml de ácido acético glacial (Panreac), en 1 l de agua destilada, una solución 10 mM de 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triásica (TPTZ) (Sigma) en HCl 40 mM (Panreac) y de una disolución de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma) 20 mM en agua destilada, en proporción [10:1:1], considerado el reactivo de FRAP o de trabajo.



Reacción 6.3: Reducción del complejo de tripiridiltriazina férrica tripiridiltriazina ferrosa, tomado de Huang et al. (2005)

Se añadieron 4 ml de reactivo en tubos de ensayo, a cada uno de ellos, se les añadieron en el siguiente orden 0,3 ml de agua destilada y 0,2-x ml de metanol en el caso del trolox, y x ml de trolox, de tal manera que las concentraciones finales obtenidas comprenden un rango entre 0 y $2,25 \cdot 10^{-2}$ mM de trolox. Se midió a 593 nm (espectrofotómetro UV-visible, Lambda EZ 210) exactamente a los 30 minutos, los resultados se expresaron en mmol de trolox equivalente por litro de muestra.

6.6.6. *O*-fenantrolina (o-fen)

Este método fue desarrollado por Berker et al. (2007). El primer paso para realizar este método fue preparar el reactivo *o*-fenantrolina que consistió en una solución de concentración final 10mM, en la que se disolvieron 0,160g de $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Panreac), con 2 ml de HCl (Panreac), en agua desionizada y por otro lado 0,198 g de 1,10-fenantrolina (Sigma) en agua desionizada, se unieron ambas disoluciones y se enrasaron a 100 ml con agua.



Reacción 6.4: Reducción del complejo férrico de fenantrolina al ferroso, tomado de Berker et al. (2007)

En matraces aforados de 25 ml, se añadieron x ml de antioxidante, 1 ml del reactivo *O*-fenantrolina, (5-x) ml EtOH al 96 % y se enrasó con agua destilada a 25 ml. Se traspasaron a tubos de ensayo incubándolos durante 30 minutos a 50°C, se enfriaron bajo el grifo y se midieron frente a un blanco de reactivos a 510 nm (espectrofotómetro UV-visible, Lambda EZ 210).

Como estándar se empleó trolox con un rango de linealidad entre 0 a $3,80 \times 10^{-2}$ mM. Los resultados de las muestras se expresaron en mmol de trolox equivalente por litro de muestra.

6.6.7. Índice de potencial antioxidante

El índice de potencial antioxidante (IPA) no es un método de evaluación de la capacidad antioxidante sino que es un parámetro que nos permite comparar los resultados de varias muestras estudiadas con varios métodos de evaluación de capacidad antioxidante. Fue establecido por Seeram et al. (2008) para poder comparar entre distintas muestras aquellas que poseían mayor capacidad antioxidante entre todos los ensayos evaluados. Para calcularlo, se aplica a cada uno de los resultados obtenidos dentro de cada uno de los métodos empleados la siguiente ecuación:

$$\text{IPA} = \frac{\text{resultado de la muestra en el ensayo}}{\text{mejor resultado del ensayo}} * 100$$

Ecuación 6.4: Cálculo del índice de potencial antioxidante. Adaptado de Seeram et al. (2008)

El IPA compuesto para una muestra consiste en la media aritmética de los índices calculados en cada uno de los ensayos realizados para dicha muestra

6.7. BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Los ensayos de bioaccesibilidad se basan, generalmente, en la simulación del proceso de digestión gastrointestinal humano. Consiste en un tratamiento secuencial enzimático en dos etapas, gástrica con pepsina a pH 1.8-2.5, e intestinal con pancreatina y sales biliares a pH 5-6.5, y posterior estimación de la fracción del componente estudiado soluble (fracción bioaccesible) o dializable a través de una membrana de determinado tamaño de poro (Cilla, 2010).

Se estimó usando una digestión *in vitro* seguida de un método de diálisis (Ramírez-Moreno et al. 2011) basado en el método descrito por Miller et al. (1981). Se ajustaron 25 ml del extracto a pH 2,0 con HCl 6M (Panreac). Se incubó a continuación en un baño de agua con 120 ml de solución de pepsina (40 mg de pepsina, Sigma P-7000 por ml de HCl 0,1M) a 37°C durante dos horas. Después de la incubación se añadieron 1,5 ml de enzima pancreática de bilis (5 mg enzima pancreática -P-1750 Sigma Aldrich-plus y 25 mg bilis porcina-B-8631 Sigma Aldrich por ml NaHCO₃ 0,1 M). La digestión de los productos se llevó a cabo en una bolsa de diálisis (Medicell 7000/2, 34 mm, punto de corte 7000 MW) y el dializado en una solución de bicarbonato sódico (Merck) a pH 7,5 durante 3 horas. Después de la diálisis se realizaron alícuotas del dializado para análisis posteriores.

7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

7.1. ANÁLISIS DE LA VARIANZA

El análisis de la varianza (ANOVA) es una potente herramienta estadística, que proporciona un análisis de la varianza total, y evalúa si uno o más conjuntos de datos difieren significativamente de los otros pero no identifican las variables que difieren. Se obtiene en cada caso el nivel de significación; si el valor p es menor o igual a 0,05, se rechazaría la hipótesis nula (la cual asume que todas las medias son iguales), aceptándose la hipótesis alternativa y por tanto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones comparadas.

Para poder distinguir cuales de las variables presentan diferencias estadísticamente significativas se emplean las pruebas post-hoc para la investigación de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) identificados en un análisis de varianza (Granato et al. 2014).

Para este análisis se empleó el ANOVA de un factor, como prueba post-hoc se empleó el método Duncan, con SPSS para Windows versión 22.0

7.2. CORRELACIÓN DE PEARSON

La correlación es un método de análisis utilizado para estudiar la posible asociación entre dos variables continuas. El coeficiente de correlación (r) es una medida que muestra el grado de asociación entre las variables. Las medidas del coeficiente de correlación del grado de asociación lineal entre los dos conjuntos de datos (A y B), y su valor se encuentra entre -1 y +1. Cuanto más cerca esté el valor absoluto, $|r|$, es a 1, más fuerte es la correlación entre los valores de los datos. La correlación entre dos variables es positiva si los valores altos para una variable se asocian con altos valores de la otra variable y negativo si una variable es baja cuando el otro es alta (Granato et al. 2014).

Para realizar este tratamiento se realizó la Correlación de Pearson bivariada, en SPSS para Windows versión 22.0.

7.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El estudio de los componentes principales estudia las correlaciones entre todos los resultados obtenidos referentes a las muestras analizadas. Para ello se consideran como variables a todos los parámetros analizados que van a caracterizar las muestras bajo estudio y como “componentes” a unas nuevas variables independientes entre sí, que se denominan componentes principales que permiten caracterizar los productos de este trabajo (bebidas no alcohólicas), ya cada componente principal estará formada por combinación de variables correlacionadas entre sí.

Para este análisis se empleó el método de análisis factorial del software SPSS para Windows versión 22.0.

Resultados

Y

Discusión

8. CAFÉ

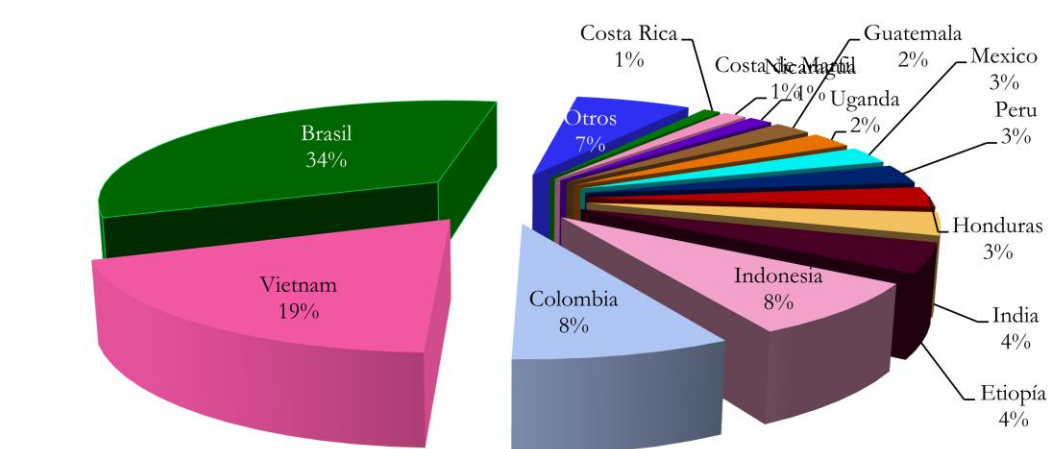
El café es el fruto del cafeto, planta perteneciente a la familia Rubiaceae, cuyas especies principales son *Coffea arabica* L y *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, que son empleadas para los cafés arábica y robusta, respectivamente (Williamson, 2011). Estas variedades se diferencian en muchos aspectos, incluyendo sus climas idóneos de cultivo, aspectos físicos y composición química (Farah, 2012). El *Coffea arabica* L es un arbusto originario de Etiopía en altas altitudes, entre 600 a 2000 m, mientras que el *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner se cultivaba en altitudes inferiores a 600 m, de Costa de Marfil, Congo y Uganda (Crozier et al. 2006b; Mussatto et al. 2011).

El café es el segundo producto de exportación más importante del mundo para los países en desarrollo después del petróleo. Es producido en unos 70 países, a menudo fuertemente dependientes de él en términos económicos (*European Coffee Federation*, ECF, 2006).

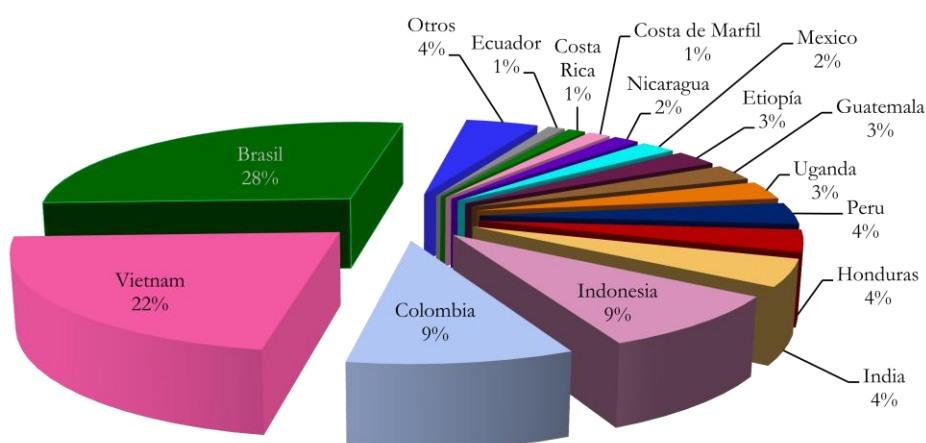
Tanto la producción como exportación e importación del café se cuantifican en miles de sacos, cada uno de ellos compuesto por 60 Kg de café (*International Coffee Organization*, ICO, 2015c). Los datos de producción y exportación del último año cafetalero 2013/2014, se detallan en el gráfico 8.1.

Según este gráfico 8.1, Brasil es el primer productor mundial con 49152 miles de sacos de café seguido por Vietnam con 27500, en el ejercicio 2013/2014 (ICO, 2015c; ICO, 2015a).

Los principales productores de café arábica son Brasil, Colombia, Etiopía, Honduras, México y Perú, mientras que Vietnam, Costa de Marfil, Indonesia y Uganda son los mayores productores de la variedad robusta (ECF, 2014).



Producción total cosecha 2013/2014



Datos de exportación totales 2013/2014

Otros: en producción y exportación: engloba a los países con una producción o exportación total o inferior a 1000 sacos de 60 Kg en el año cafetalero 2013/2014

Gráfico 8.1: Producción y exportación total del año cafetalero 2013/2014. Elaboración propia con datos de ICO (2015c) e ICO (2015a)

En relación a los países importadores de café verde, la Unión Europea se situó en el año 2013 como el primer importador mundial, tal como se puede ver en el gráfico 8.2 (ICO, 2015 b), dentro de la Unión Europea el mayor importador Alemania con un 29 %.

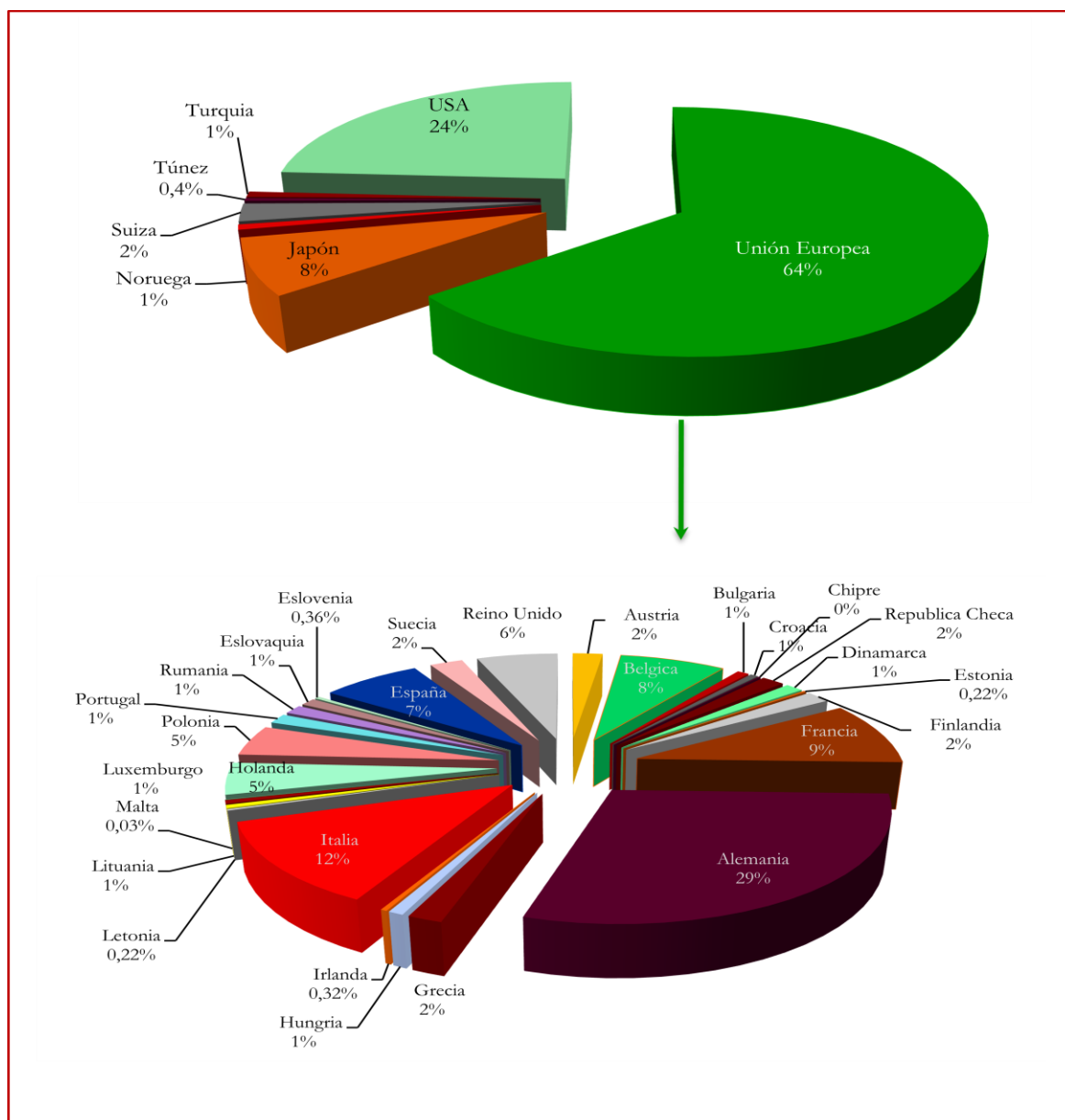


Gráfico 8.2: Principales países importadores en el año 2013 (ICO, 2015b)

La Unión Europea no sólo es un importante importador de café verde, además es un importante exportador de producto finalizado como café tostado descafeinado y extracto de café (café soluble) (ECF, 2006).

El café es una bebida que se obtiene por la infusión de los granos tostados y molidos de las bayas o cerezas del café. Beber café es apreciado en todo el mundo debido a su agradable sabor y aroma y también debido a sus propiedades fisiológicas y psicoactivas (Dórea y da Costa, 2005; Farah, 2012).

El café ocupa el segundo puesto en el consumo de bebidas después del agua, en la mayoría de los países occidentales. A menudo el consumo del mismo es debido a sus efectos estimulantes, ya que es rico principalmente en cafeína (Butt y Sultan, 2011), además es una de las principales fuentes de ácido clorogénico de la dieta (Del Rio et al. 2013).

La composición de la infusión de café depende de distintos factores, principalmente de la variedad de café utilizado, seguido del proceso tecnológico industrial empleado desde las cerezas del café verde y también del modo de prepararlo por parte del consumidor (Debry, 1994).

El café es una mezcla compleja de varios compuestos entre los que se incluyen hidratos de carbono, compuestos nitrogenados, vitaminas, minerales, alcaloides, melanoidinas, y compuestos fenólicos (Williamson, 2011). Dentro de estos compuestos destacan fenoles como el ácido clorogénico y caféico, lactonas, diterpenoides (cafestol y kahweol), niacina, vitamina B3, además es rico en magnesio y potasio (Cano-Marquina et al. 2013).

La forma de consumo habitual es la infusión del grano tostado y molido, además del café soluble o instantáneo (Oliveira et al. 2012).

El café instantáneo es la respuesta a la demanda de un estilo de vida donde se deja un tiempo mínimo para la preparación de los alimentos, ya que, en este caso, sólo es necesario disolverlo en agua (Debry, 1994; Oliveira et al. 2012). La producción de café instantáneo consiste en un tratamiento del café tostado con agua caliente y alta presión para extraer los compuestos solubles, seguido de un proceso de concentración y posterior deshidratación, por secado o liofilización. El secado alta temperatura y a alta presión que se volatilice el agua obteniéndose un polvo muy fino, que posteriormente conlleva un proceso de aglomeración, para obtener un producto más uniforme. La liofilización, en cambio emplea bajas temperaturas para lograr sublimación del agua, este proceso confiere al producto final una calidad superior a la de otros métodos (Mussatto et al. 2011; Farah, 2012).

Para la obtención del café soluble es preferible el café robusta ya que tiene mayores rendimientos en la extracción (Crozier et al. 2006b) puesto que esta variedad presenta un mayor contenido en sólidos solubles (Farah, 2012). Debido al procesado el café soluble o instantáneo es diferente en su composición al café tostado (Briandet et al. 1996). Estas diferencias quedan reflejadas en la figura 8.1.

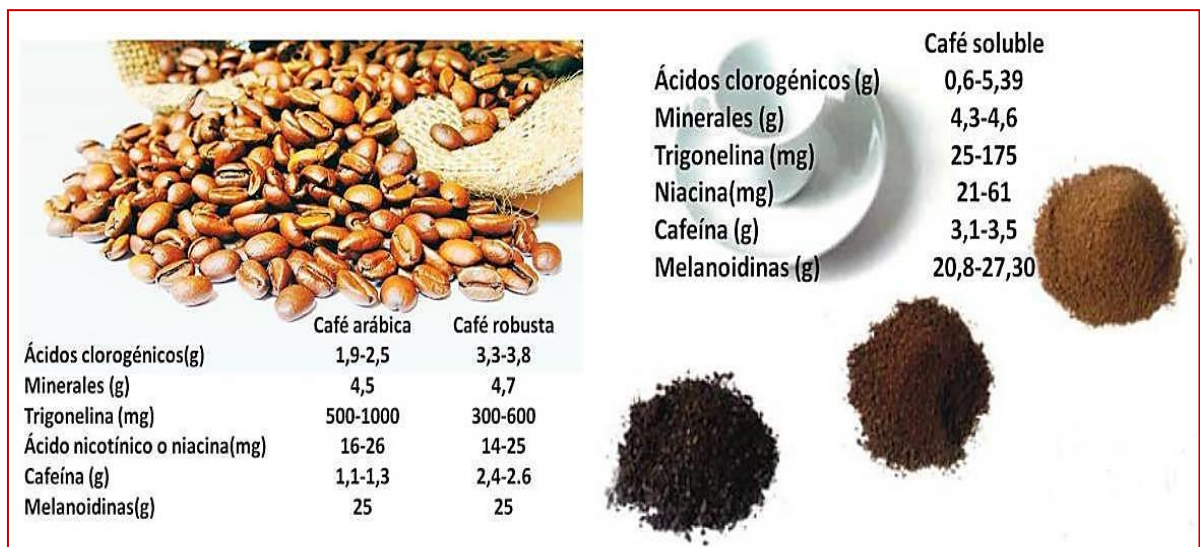


Figura 8.1: Comparación de la composición de 100 g de café grano tostado con 100 g de café soluble. Adaptado de Debry (1994); Rovira (2001); Nogueira y Trugo, (2003); Vignoli et al. (2007); Giner, (2009); NUTTAB database, (2010); USDA database, (2010); Farah, (2012)

En la actualidad el café está siendo ampliamente estudiado debido a sus efectos beneficiosos sobre distintas enfermedades, como la diabetes (Sartorelli et al. 2010), el cáncer (Kang et al. 2011), y las enfermedades cardiovasculares (O'Keefe et al. 2013). El compuesto bioactivo más estudiado en el café ha sido principalmente la cafeína debido a sus efectos sobre una serie de funciones como la estimulación del sistema nervioso central y la estimulación del músculo cardíaco y la relajación muscular especialmente para actuar sobre el riñón para producir diuresis. Las evidencias científicas sobre los efectos beneficiosos del café son numerosas y se atribuyen fundamentalmente a los compuestos polifenólicos de la familia de los ácidos hidroxycinámicos (ácido clorogénico y derivados) (George et al. 2008; Bravo et al. 2010).

Los **ácidos clorogénicos** son conocidos no sólo por su contribución final a la acidez, astringencia y amargor del café sino también por sus propiedades antioxidantes (Ludwig et al. 2012). Son una familia de ésteres formados por ciertos ácidos *trans*-cinámicos y el ácido (-) quínico. Los que se han determinado en el café son el cafeoilquínico, *p*-cumaroilquínico, feruloilquínico, dicaferuloilquínico y cafeoilferuloilquínico. En el café sus posiciones de esterificación son 3, 4 y 5 del ácido quínico (Clifford et al. 2003).

Las bayas de café son una de las mayores fuentes de ácidos clorogénicos; dependiendo de las especies pueden constituir entre el 6 y el 10 % de ácidos clorogénicos expresados en materia seca. Aunque durante el procesado se pierden cantidades significativas de ácidos clorogénicos, entre 8 al 10 % del total con cada 1 % de materia seca perdida durante el tostado, tanto en las mezclas de café tostado como en el café soluble sobreviven cantidades sustanciales (Clifford, 1999).

Una taza de café proporciona entre 20 y 675 mg de ácidos clorogénicos dependiendo del grado de tostado y del volumen consumido, así los consumidores regulares pueden ingerir fácilmente una ingesta superior a 1 gramo por día (Del Rio et al. 2010b). De hecho, del estudio PREDIMED se deriva que la mayor fuente de polifenoles de la dieta española es el café (Tresserra-Rimbau et al. 2013).

Normativas aplicables al café soluble

El Real Decreto 1676/2012, de 14 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad para el café, lo define así:

«Café soluble», «café instantáneo», «extracto de café» o «extracto de café soluble»: es el producto concentrado obtenido por extracción de los granos de café tostados, utilizando solamente agua como medio de extracción, con exclusión de cualquier procedimiento de hidrólisis por adición de ácido o base. Además de las sustancias insolubles tecnológicamente inevitables y de los aceites insolubles procedentes del café, el extracto de café sólo deberá contener los componentes solubles y aromáticos del café.

El contenido de materia seca procedente del café deberá ser:

- a) Para el extracto de café (café soluble o instantáneo): Igual o superior al 95 por ciento en masa.
- b) Para el extracto de café en pasta: Del 70 al 85 por ciento en masa.

Respecto a las mezclas de café soluble con sucedáneos de café el Real Decreto 2362/1985, autorizó su comercialización. Este Real Decreto indica que las mezclas de extractos solubles de café y de extractos solubles de sucedáneos de café, así como los extractos solubles de las mezclas de café tostado y de sucedáneos de café tostados, sólo pueden comercializarse si su elaboración cumple los requisitos técnico-sanitarios y los productos las características fisicoquímicas fijadas en la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, almacenamiento, transporte y comercialización del café, Real Decreto 664/1983 (en la actualidad establecida en el Real Decreto 1676/2012) y en la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, almacenamiento, transporte y comercialización de sucedáneos de café, aprobada por Real Decreto 2323/1985.

Las denominaciones de los productos autorizados serán, en función de sus ingredientes, las siguientes:

- Cuando el café no haya sido sometido a proceso de descafeinización: «Mezcla de solubles de café (%) y achicoria (%)», «mezcla de solubles de café (%) y cereales tostados (%)» y «mezcla de solubles de café (%), achicoria (%) y cereales tostados (%)».
- Cuando el café haya sido sometido a proceso de descafeinización, según lo estipulado «mezcla de solubles de café descafeinado (%) y achicoria (%)», «mezcla de solubles de café descafeinado (%) y cereales tostados (%)», y «mezcla de solubles de café descafeinado (%), achicoria (%) y cereales tostados (%)».

Como se ha mencionado anteriormente, los sucedáneos de café están regulados a su vez por el Real Decreto 2323/1985:

Sucedáneos de café: Son los productos de origen vegetal, tostados, destinados a efectuar preparaciones que reemplacen a la infusión de café como bebida frutiva. Dichos productos, que pueden comercializarse en grano o molidos con textura de sémola, polvo, granulados o prensados, son los siguientes:

- **Achicoria tostada:** Es el producto elaborado con la raíz de la planta de *Cichorium intybus* L., convenientemente lavada, limpia, troceada, desecada, tostada y molida. Se excluyen aquellas plantas que se utilicen para la producción en endibias (achicoria witloof).
- **Malta de cebada tostada:** Es el producto de color uniforme obtenido por tostado de la malta verde procedente de cebada en grado de germinación apropiado.
- **Cebada tostada:** Es el producto obtenido por el tueste de los frutos sanos y secos procedentes de la especie botánica *Hordeum vulgare* L.

También estableció sus características fisicoquímicas como humedad y contenido en cenizas para cada uno de estos sucedáneos. Además de sus denominaciones de venta y comercialización.

Consumo de café

En España, según la encuesta ENIDE, el consumo de café y otras bebidas estimulantes se distribuye según el gráfico 8.3:

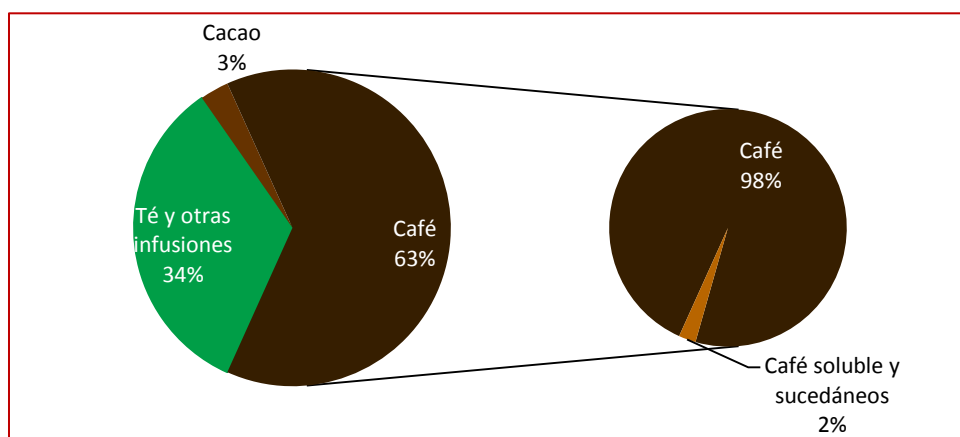


Gráfico 8.3: Consumo diario según la encuesta ENIDE de bebidas estimulantes en España (2011)

El consumo de café en España equivale a 24.140 millones de tazas al año o lo que es lo mismo, 599 tazas por habitante al año (Bravo et al. 2010). El gráfico 8.4 distribuye el consumo de café según el panel de consumo (MAGRAMA, 2014) por tipo de café en el hogar.

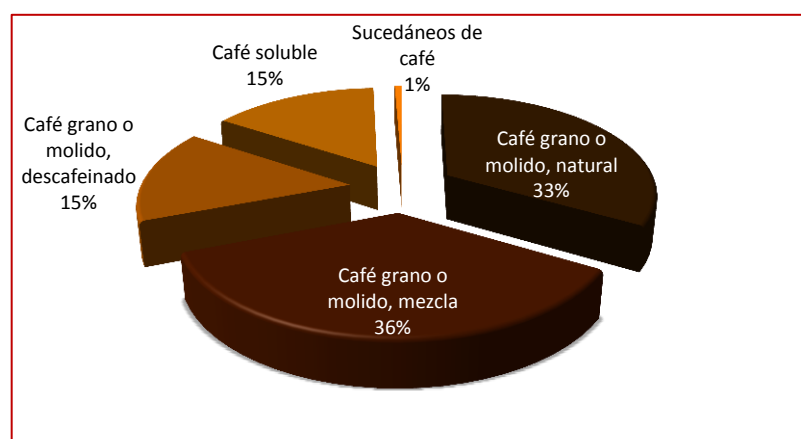


Gráfico 8.4: Consumo per cápita de café en el hogar en España en 2013 (MAGRAMA, 2014)

Si comparamos ambos gráficos 8.3 y 8.4, se observan las diferencias existentes entre la proporción de café soluble según los hábitos de compra (panel de consumo en el hogar), y según la encuesta ENIDE. Este hecho puede ser debido a que el 94,6 % del café consumido fuera del hogar es expreso, mientras que el café soluble consumido fuera del hogar, en el canal HORECA (Hoteles, Restaurantes, Cafeterías), constituye el 5,4 % (Fórum Café, 2012).

Según datos de la Federación Española del Café, España es el segundo productor europeo de café soluble, con un volumen de 43.000 toneladas, de las que el 70 % se destina a la exportación. Como se ha mencionado anteriormente la variedad más utilizada para la elaboración de soluble es el café robusta que se importa de países como Vietnam (Resa, 2011).

El café soluble o instantáneo es un producto que se consume habitualmente en España, sin que se haya observado prácticamente ninguna variación entre los años 2004 y 2013 con un consumo *per cápita* se sitúa en torno a los 200 g/año por persona (MAGRAMA, 2014).

Se da la circunstancia, además, que el café soluble ha contribuido al desarrollo del consumo del café en ciertos países tradicionalmente bebedores de té, como es el caso de Japón o Gran Bretaña, país, este último, máximo consumidor europeo de este tipo de café (Rovira, 2001). Concretamente en Gran Bretaña, el 95 % del café consumido es soluble debido a que para su preparación sólo es necesario adicionar agua caliente (Duthie y Crozier, 2003).

8.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo, según diversos estudios es la principal fuente de polifenoles en la dieta española. Entre los distintos tipos de café comerciales, el consumo de café soluble se ha mantenido constante en España, principalmente en el hogar, en la última década, situándose en 200 g anuales *per cápita*. Por este motivo es importante acometer los siguientes objetivos:

- Caracterización del café soluble: evaluación del contenido en polifenoles totales, familias polifenólicas y ácidos orgánicos.
- La evaluación de la capacidad antioxidante del café soluble.
- Evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos del café soluble: familias polifenólicas y ácidos orgánicos, y de sus efectos antioxidantes potenciales.

8.2. MUESTREO

El plan de trabajo se dividió en tres partes, el muestreo, la caracterización del café soluble (evaluación de sus compuestos bioactivos y capacidad antioxidante) y la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos y sus efectos potenciales. Para evaluar la bioaccesibilidad fue necesaria la caracterización de los cafés solubles una vez digeridos y dializados.

Las muestras de café soluble se seleccionaron en distintos supermercados de la Comunidad de Madrid en junio de 2011. Dentro de este muestreo se escogieron muestras que presentaban el café soluble en forma de aglomerado y otras en forma de polvo. Se seleccionaron 11 muestras, 6 cafés solubles regulares, 3 cafés solubles descafeinados y 2 mezclas, una que presentaba mezcla de café verde y café tostado y otra que presentaba una mezcla de achicoria y café. La descripción del muestreo se recoge en la tabla 8.1.

Tabla 8.1: Descripción del muestreo de café soluble

Muestra	Producto	Descripción
C1R	Café soluble	
C2R	Café soluble	Puro arábica de Colombia
C3R	Café soluble	
C4R	Café soluble	Puro arábica, café soluble liofilizado
C5R	Café soluble	
C6R	Café soluble	Natural con antioxidantes
C7D	Café soluble descafeinado	
C8D	Café soluble descafeinado	
C9D	Café soluble descafeinado	Con antioxidantes
C10V	Mezcla	35 % Café verde-65 % café tostado
C11A	Mezcla	60 % achicoria soluble-38 % café soluble- 2 % sulfato de magnesio

Para la identificación se escribieron 3 caracteres alfanuméricos, el primero común para todos fue C (café), el segundo un dígito del 1 al 11 para ordenar las muestras y el tercero de los caracteres está en función de los grupos en los que se podría separar el café normal o regular (R), descafeinado (D) y los dos últimos cafés recogidos en la tabla 8.1, son mezclas formadas en el caso C10V por café verde (V) y café soluble tostado, y en el caso de C11A formado por una mezcla de achicoria (A) y café soluble.

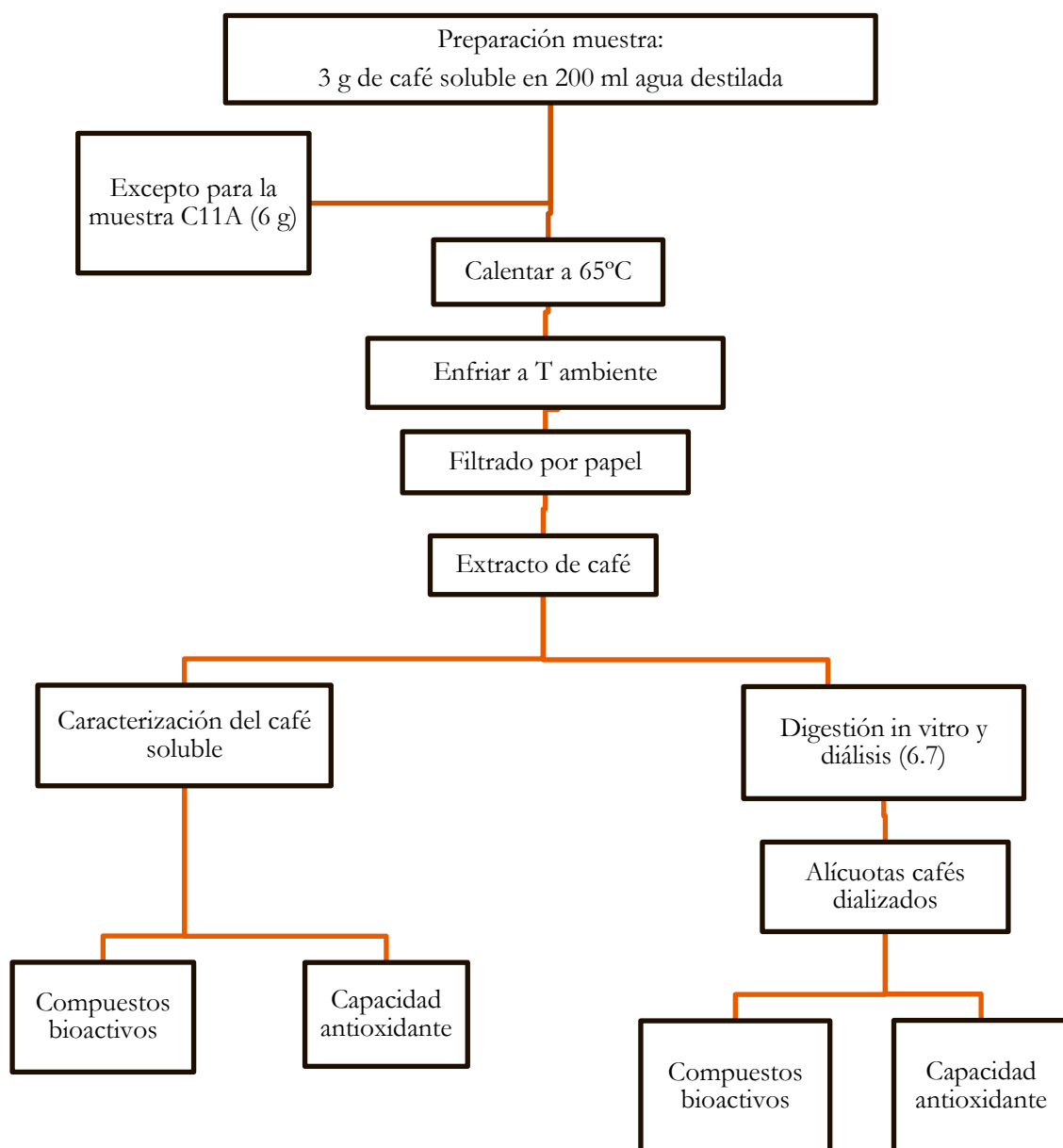
Dentro de los cafés normales o regulares, hay dos muestras que se diferencian del resto porque en su composición sólo presentan café Arábica (C2R y C4R).

8.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Como se ha mencionado anteriormente, primero se realizó la caracterización del café soluble: evaluación de polifenoles totales y familias polifenólicas (ácidos hidroxicinámicos y flavonoles), el contenido en ácidos orgánicos y la capacidad antioxidante de los cafés solubles.

Para las muestras dializadas se realizó la evaluación de las familias polifenólicas, el contenido en ácidos orgánicos y la capacidad antioxidante de los dializados de café soluble. En el esquema 8.1, se recoge la preparación de la muestras para la obtención del extracto de café y la cantidad de extracto de café que se empleó en su digestión y diálisis posterior:

Esquema 8.1: Preparación de muestras para la caracterización del café soluble y el análisis de dializados



8.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

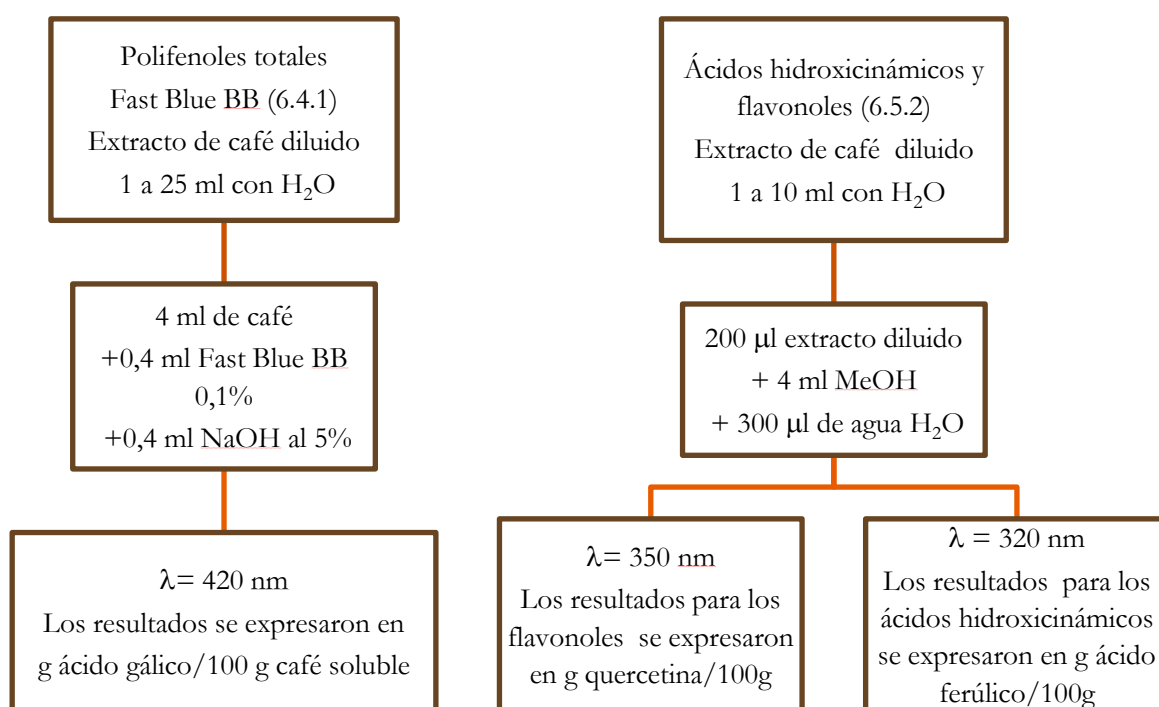
Los resultados y discusión para el café soluble se dividen en tres secciones, la caracterización del café soluble, la caracterización de sus dializados, incluyendo en ambos casos la determinación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante, y la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos que contiene y sus efectos potenciales.

8.4.1. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en el café soluble

Polifenoles totales y Familias fenólicas

La evaluación de los polifenoles totales se realizó por el método Fast Blue BB y además se evaluó su contenido en familias polifenólicas. La metodología empleada para estas determinaciones se detalla esquemáticamente (esquema 8.2) a continuación:

Esquema 8.2: Metodología empleada en los extractos de café soluble para la determinación de polifenoles totales y familias polifenólicas



Los resultados del contenido en polifenoles totales, por el método Fast Blue BB (FBBB) junto con la estimación de familias polifenólicas: ácidos hidroxycinámicos y flavonoles se muestran en la tabla 8.2.

Tabla 8.2: Contenido en polifenoles totales y familias fenólicas

Muestra	Polifenoles Totales	Hidroxycinámicos	Flavonoles
	g ácido gálico/100 g café soluble	g ácido ferúlico/100 g café soluble	g quercetina/100 g café soluble
C1R	$12,96 \pm 2,93^{bc}$	$6,56 \pm 0,07^d$	$6,66 \pm 0,07^{de}$
C2R	$15,53 \pm 0,04^f$	$7,46 \pm 0,02^h$	$7,10 \pm 0,03^f$
C3R	$12,55 \pm 1,05^b$	$6,68 \pm 0,14^e$	$6,53 \pm 0,16^{cd}$
C4R	$15,18 \pm 0,22^{ef}$	$7,30 \pm 0,03^g$	$7,13 \pm 0,06^f$
C5R	$15,20 \pm 0,33^{ef}$	$7,11 \pm 0,13^f$	$6,77 \pm 0,15^e$
C6R	$14,09 \pm 0,02^d$	$7,09 \pm 0,13^f$	$7,20 \pm 0,13^f$
C7D	$12,23 \pm 0,30^b$	$6,43 \pm 0,04^c$	$6,59 \pm 0,04^d$
C8D	$14,38 \pm 0,31^{de}$	$6,07 \pm 0,10^b$	$6,21 \pm 0,11^b$
C9D	$13,59 \pm 0,35^{cd}$	$6,34 \pm 0,12^c$	$6,42 \pm 0,13^c$
C10V	$15,54 \pm 0,16^f$	$8,66 \pm 0,11^i$	$8,31 \pm 0,12^g$
C11A	$8,62 \pm 0,70^a$	$3,73 \pm 0,05^a$	$3,85 \pm 0,05^a$

Letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas.

Los rangos de concentración para los polifenoles totales están comprendidos entre 8,62 y 15,54 g ácido gálico/100 g, para los ácidos hidroxycinámicos están comprendidos entre 3,73 y 8,66 g de ácido ferúlico por 100 g de muestra y entre 3,85 y 8,31 g quercetina por 100 g de café soluble para los flavonoles. Los mayores valores para polifenoles totales y familias se hallaron en la muestra C10V, mientras que los menores se obtuvieron en C11A.

En el contenido de polifenoles totales las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos cafés solubles, son menores que en ambas familias, distinguiendo 6 grupos en los polifenoles totales, 8 en los ácidos hidroxicinámicos y 7 en los flavonoles. En los polifenoles totales se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los cafés solubles regulares, en conjunto, y los cafés solubles descafeinados, aunque todos los cafés presentaron diferencias con la mezcla C11A. En cambio, si hay diferencias estadísticamente significativas en el contenido de ácidos hidroxicinámicos entre todos los tipos de café soluble, regulares, descafeinados y cada una de las mezclas analizadas.

El contenido en polifenoles totales determinado por el método Fast Blue BB, son similares a los obtenidos por Brezová et al. (2009) en distintos cafés solubles, con un rango de 116 a 140 mg ácido gálico/g (11,6 a 14,0 g ácido gálico/100 g) y Sánchez-González et al. (2005) con un resultado obtenido en café soluble preparado de 12,1 mg ácido gálico/100 g.

Los valores obtenidos en la determinación de ácidos hidroxicinámicos, en la muestra C10V, son similares a los obtenidos por Ramalakshmi et al. (2008), en la determinación de ácidos clorogénicos 8,53 g/100 g, en cerezas o bayas de café ligeramente tostado.

Ácidos orgánicos

Para la determinación de los ácidos orgánicos en los extractos de café se empleó el método 6.3, tomando 1 ml del extracto llevándolo a 10 ml de fase móvil, seguido de la filtración por papel y la microfiltración, y empleando un volumen de inyección de 20 µl. Las condiciones cromatográficas empleadas son flujo 0,4 ml/min y la longitud de onda de detección de 215 nm.

En el análisis de los ácidos orgánicos en los extractos de café se determinaron en todas las muestras los ácidos quínico, acético, cítrico y fumárico, y el ácido piroglutámico, y en una de las mezclas (C11A) se identificó ácido succínico. En estas condiciones experimentales no se identificó el ácido clorogénico. Los resultados se muestran en la tabla 8.3.

En la figura 8.2 se recogen como ejemplo los perfiles cromatográficos de los ácidos orgánicos de las muestras C1R y C11A, (del extracto de café), en la cual se puede observar que a excepción de la presencia de ácido succínico en C11A, el perfil de ambos cafés es similar.

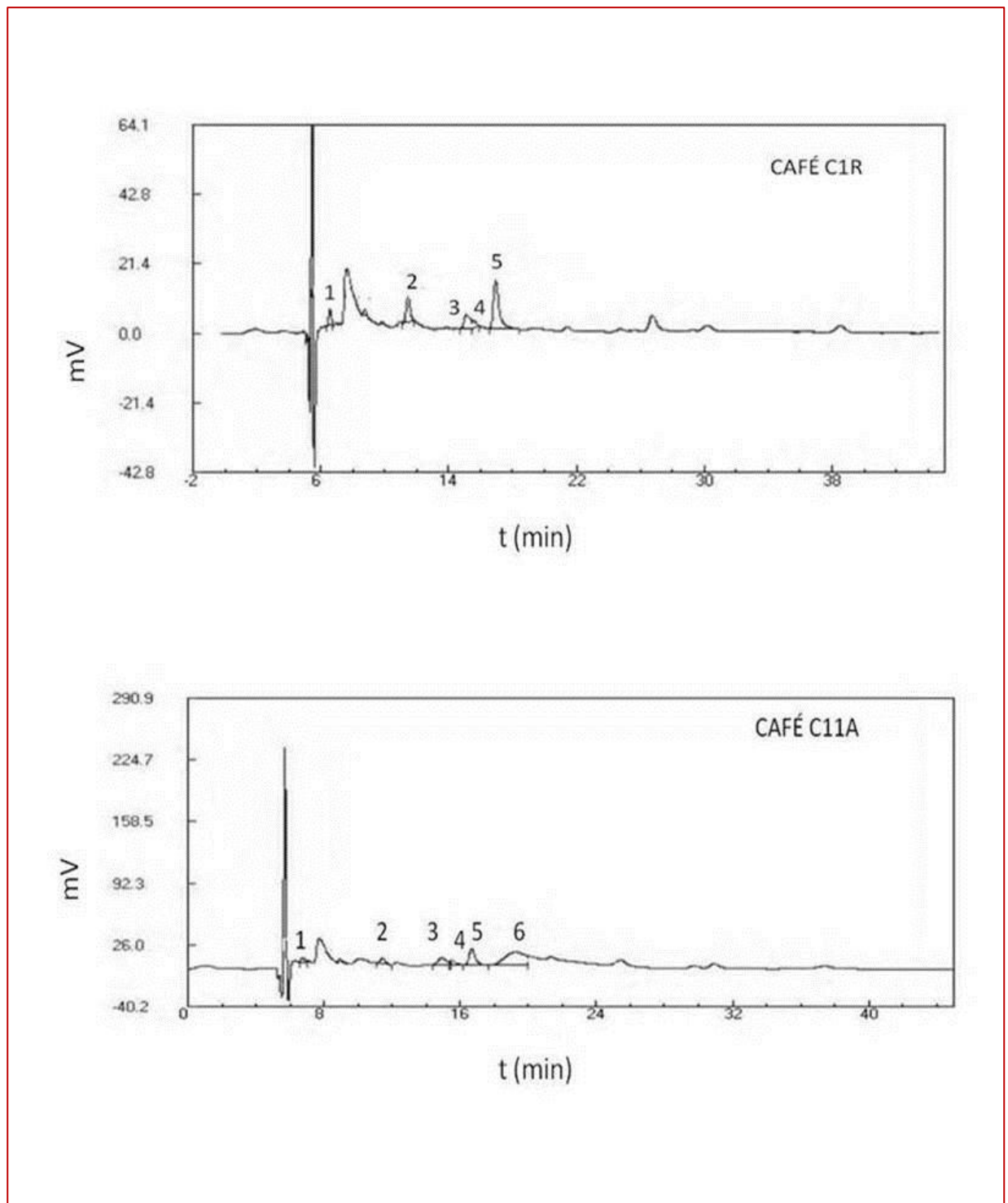


Figura 8.2. Ejemplos de perfiles cromatográficos del extracto de café donde 1 ácido quínico, 2 ácido acético, 3 ácido piroglutámico, 4 ácido cítrico, 5 ácido fumárico y 6 ácido succínico.

Tabla 8.3: Contenido en ácidos orgánicos del café soluble expresado en mg ácido en 100 g de café soluble

Muestra	Quínico	Acético	Piroglutámico	Cítrico	Fumárico	Succínico
C1R	3479,22 ± 89,75 ^d	5938,50 ± 477,7 ^{ef}	3962,43 ± 319,13 ^b	728,63 ± 51,36 ^{abc}	58,94 ± 1,66 ^c	n.d
C2R	2451,20 ± 326,33 ^c	6242,48 ± 221,24^f	2700,77 ± 157,62 ^a	879,95 ± 67,75 ^{bc}	55,52 ± 3,16 ^{bc}	n.d
C3R	5092,07 ± 145,05^d	4731,69 ± 173,31 ^c	4616,91 ± 163,53 ^{bc}	1707,63 ± 161,16 ^{fg}	72,34 ± 6,74 ^d	n.d
C4R	1781,82 ± 63,62 ^b	4356,10 ± 457,90 ^{bc}	4382,17 ± 139,01 ^{bc}	783,97 ± 127,69 ^{abc}	53,38 ± 7,14 ^{bc}	n.d
C5R	4075,60 ± 508,78 ^e	4884,11 ± 250,00 ^{cd}	6050,16 ± 491,05^d	1362,28 ± 95,46 ^c	72,26 ± 8,02 ^d	n.d
C6R	1555,18 ± 10,02 ^{ab}	5427,52 ± 268,03 ^{de}	4100,47 ± 145,37 ^b	1111,27 ± 93,35 ^d	79,30 ± 2,50^d	n.d
C7D	3618,28 ± 539,44 ^{de}	3878,34 ± 78,22 ^c	4955,64 ± 142,64 ^c	941,22 ± 58,43 ^d	47,45 ± 2,28 ^b	n.d
C8D	2723,52 ± 387,03 ^c	4626,44 ± 379,96 ^c	4512,97 ± 449,47 ^{bc}	673,65 ± 70,86 ^{ab}	55,19 ± 5,15 ^{bc}	n.d
C9D	1622,53 ± 96,70 ^{ab}	4859,12 ± 413,50 ^{cd}	4623,27 ± 436,79 ^{bc}	1903,36 ± 134,16^g	75,65 ± 4,24 ^d	n.d
C10V	2666,10 ± 124,69 ^c	4423,06 ± 155,05 ^{bc}	2543,41 ± 280,76 ^a	1676,87 ± 7,01 ^f	54,96 ± 8,97 ^{bc}	n.d
C11A	1154,65 ± 144,10 ^a	1625,66 ± 34,20 ^a	2373,76 ± 206,09 ^a	593,73 ± 35,53 ^a	25,00 ± 0,62 ^a	3294,63 ± 331,48^a

Letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas.

n.d: No detectado

El ácido mayoritario en todas las muestras analizadas fue el ácido acético seguido por el aminoácido piroglutámico y el ácido quínico. De hecho uno de los ácidos que mayoritariamente contribuye a la acidez del café, es el ácido acético, que proviene de la pirolisis de los hidratos de carbono (Debry, 1994).

Estos tres ácidos mayoritarios incrementan su concentración con el efecto del tostado al contrario que lo hace el ácido cítrico (Debry, 1994), por este motivo y en relación con los resultados obtenidos, si se compara la muestra C10V, que está constituida por un 35 % de café verde, se observa que sus concentraciones tanto de ácido quínico como de piroglutámico son menores que en las muestras de café regular o normal.

La presencia en el café soluble del ácido piroglutámico también fue determinada por Galli y Barbas, (2004) en café liofilizado con una cantidad de 8,8 g ácido piroglutámico por 100 g de café, que podrían compararse con el café C5R que contiene una cantidad que supera los 6 g de ácido piroglutámico por 100 g de café soluble.

El ácido piroglutámico es un aminoácido que tiene un número de efectos potenciadores cognitivos notables, que podrían ser también relacionados con las propiedades del café tradicionalmente asociadas con cafeína. El ácido piroglutámico se incrementa en gran medida en el café liofilizado y, probablemente, el aumento está relacionado con alguna etapa del proceso industrial, que debe ser considerado (Galli y Barbas, 2004).

Al observar la tabla 8.3 el contenido de ácido cítrico varía entre 593,73 y 1903,56 mg de ácido cítrico/100 g de café soluble, que es una concentración relativamente baja en comparación con el acético o el quínico, por el diferente comportamiento de los ácidos orgánicos durante el proceso de tostado citado anteriormente (Debry, 1994).

La concentración de los ácidos orgánicos de C11A, a excepción del ácido succínico, es prácticamente la mitad que en las demás muestras analizadas, lo que se explica porque esta mezcla sólo contiene un 38 % de café soluble.

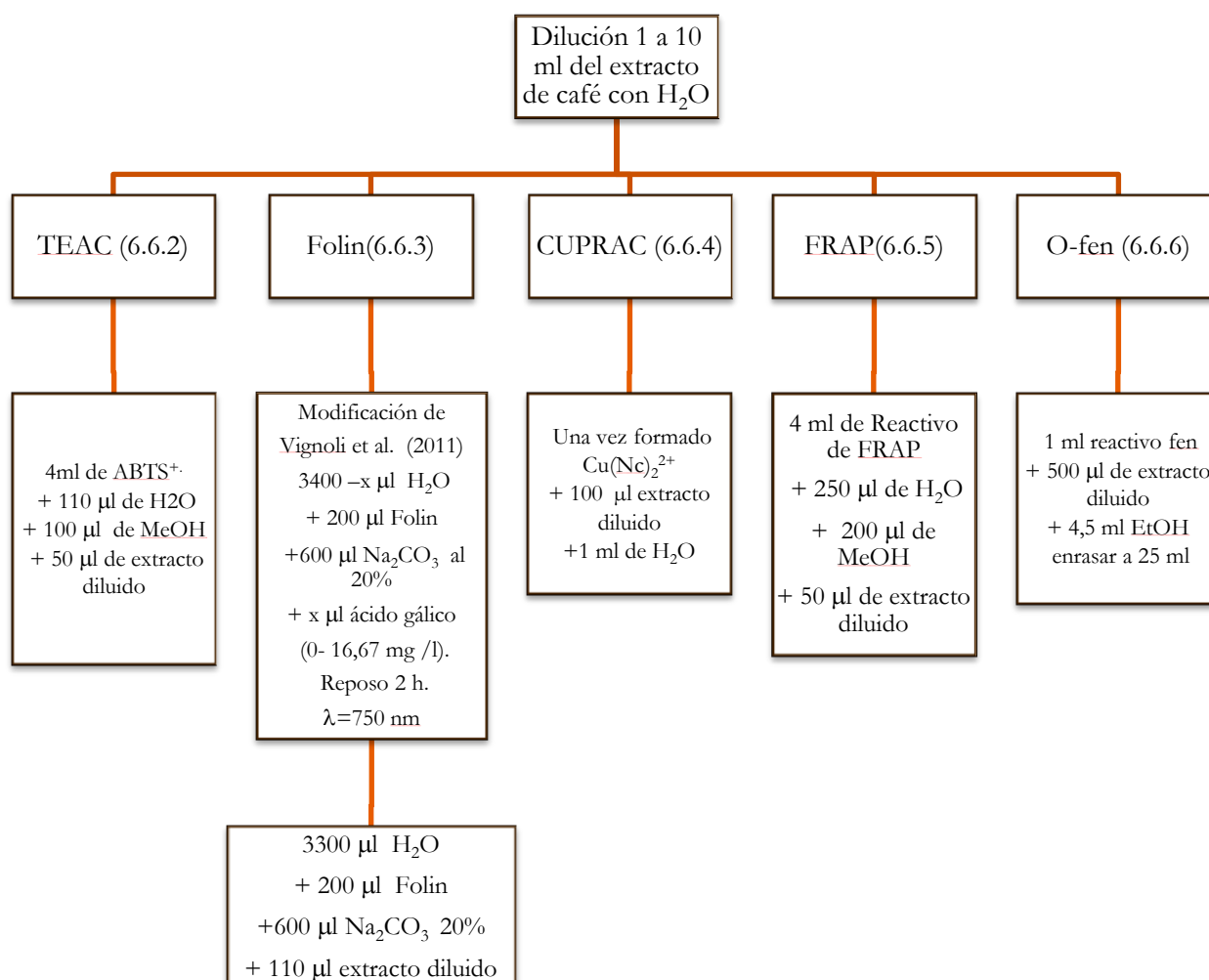
El ácido succínico es el ácido mayoritario en C11A, este ácido ha sido identificado en achicoria (constituye un 60 % de la mezcla) por Papetti et al. (2013), además han determinado que este ácido junto con el ácido quínico presentaron actividad antibacteriana concretamente anti-caries y anti-gingivitis.

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante fue evaluada por cinco métodos distintos; Folin, CUPRAC, FRAP, TEAC y *O*-fenantrolina (*o*-fen). Este último método a diferencia de los otros cuatro presenta una incubación en su procedimiento lo que provoca que sus resultados sean distintos a otros con la misma aproximación química (capacidad reductora), ya que la incubación a una temperatura aproximada a los 50 °C, aumenta la velocidad de reacción (Berker et al. 2007).

La metodología para la evaluación de la capacidad antioxidante del café se detalla esquemáticamente a continuación:

Esquema 8.3: Metodología aplicada al extracto de café soluble para la evaluación de la capacidad antioxidante



Los resultados obtenidos en el ensayo están reflejados en la tabla 8.4, en el Folin se expresaron en g ácido gálico/100 g café soluble, mientras que para los otros cuatro métodos se expresaron en mmol trolox equivalente/100 g de café soluble. En todos los ensayos realizados en el café soluble se observa una tendencia en las muestras, ésta es que el menor valor de capacidad antioxidante obtenido es para la muestra C11A, en todos los métodos prácticamente la mitad del mayor valor obtenido.

Tabla 8.4: Capacidad antioxidante en muestras de café soluble, expresados por g de café soluble

Muestra	Folin g gálico/100 g	CUPRAC mmol TE/100 g	FRAP mmol TE/100 g	TEAC mmol TE/100 g	0-fen mmol TE/100 g
C1R	15,92 ± 0,23 ^{fg}	147,99 ± 12,65 ^{de}	72,52 ± 3,32 ^d	122,47 ± 2,45 ^c	105,07 ± 1,56 ^d
C2R	15,09 ± 0,05 ^d	140,26 ± 10,80 ^{cd}	53,83 ± 1,45 ^b	111,59 ± 1,71 ^b	107,62 ± 5,88 ^{de}
C3R	15,50 ± 0,12 ^{de}	168,89 ± 2,45^f	61,57 ± 1,21 ^c	137,90 ± 1,77 ^e	91,08 ± 2,44 ^c
C4R	16,20 ± 0,17^g	152,19 ± 2,22 ^{ef}	82,73 ± 7,04^e	146,34 ± 2,90 ^f	134,05 ± 7,42 ^f
C5R	15,69 ± 0,39 ^{ef}	149,41 ± 3,23 ^{de}	81,03 ± 2,73 ^e	147,58 ± 5,43^f	139,09 ± 7,24^f
C6R	15,13 ± 0,15 ^d	142,90 ± 3,33 ^{cd}	70,47 ± 2,75 ^d	124,46 ± 4,15 ^e	118,26 ± 2,63 ^e
C7D	15,25 ± 0,08 ^{cd}	129,60 ± 5,99 ^{bc}	69,73 ± 2,09 ^d	134,90 ± 4,83 ^e	112,78 ± 3,16 ^{de}
C8D	14,93 ± 0,18 ^c	143,48 ± 5,36 ^{cd}	52,21 ± 1,87 ^b	133,39 ± 5,32 ^e	85,26 ± 2,31 ^b
C9D	14,39 ± 0,41 ^b	128,00 ± 1,64 ^b	61,44 ± 1,97 ^c	117,62 ± 2,18 ^c	112,07 ± 4,39 ^{de}
C10V	15,99 ± 0,50 ^{fg}	159,43 ± 6,24 ^{ef}	55,78 ± 1,47 ^b	121,26 ± 3,68 ^c	112,48 ± 6,46 ^{de}
C11A	8,99 ± 0,20 ^a	67,12 ± 0,77 ^a	42,07 ± 1,02 ^a	72,34 ± 2,43 ^a	66,11 ± 2,63 ^a

TE: trolox equivalente.

Letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas.

Los rangos obtenidos por los cinco métodos fueron para el Folin 8,99 (C11A) a 16,20 (C4R) g ácido gálico/100 g, para el CUPRAC 67,12 (C11A) a 168,89 mmol TE/100 g (C3R), para el FRAP 42,07 (C11A) a 82,73 mmol TE/100 g, para el TEAC 72,34 (C11A) a 147,58 (C5R) mmol TE/100 g y para la *O*-fenantrolina 66,11(C11A) a 139,09 (C5R) mmol TE/100 g.

Estos valores son comparables con los valores obtenidos por Vignoli et al. (2011) en cafés solubles con diferentes grados de tostado en el método Folin 12,08 a 18,54 g ácido gálico por 100 g muestra

Para el método TEAC los resultados obtenidos en las muestras de café soluble analizadas son similares a los obtenidos por Vignoli et al. (2011), con valores comprendidos entre 18,77 a 36,05 g trolox/100 g (que equivalen a 74,99 a 144,03 mmol TE/100 g), y mayores a los obtenidos por Brezová en cafés solubles comerciales con un rango de concentraciones entre 0,59 a 0,82 mmol TE/g (59,0 a 82,0 mmol TE/100 g), ya que el único valor que se encuentra dentro de este intervalo es el C11A que contiene un 38 % de café soluble. Si bien son inferiores a los obtenidos por ellos en el FRAP por Vignoli et al. (2011) y Sánchez-González et al. (2005), cuyos valores obtenidos fueron 19,27 a 35,04 g trolox/100 g (76,99 a 140,0 mmol TE/100 g) y 1007 μ mol TE/g (100,7 mmol TE/100 g) respectivamente.

En cuanto al valor mayor obtenido en el café soluble dependiendo del método de evaluación, en el CUPRAC corresponde al café C3R, en el Folin y el FRAP este máximo fue para el café C4R, mientras que para el TEAC y la *O*-fenantrolina fue la muestra C5R la que presentó una mayor capacidad antioxidante.

Para determinar el orden de capacidad antioxidante de los cafés solubles evaluados se calculó el índice de potencial antioxidante (IPA) compuesto. Para ello se aplicó la ecuación 6.4, con la que se calculó el IPA individual de cada valor obtenido para cada café soluble en cada uno de los ensayos realizados.

Una vez calculados los índices de todos los cafés solubles en cada uno de los cinco métodos empleados, el IPA compuesto para cada café soluble es la media aritmética de sus cinco índices obtenidos. Estos resultados están recogidos en la tabla 8.5.

En la tabla 8.5, los índices individuales de todos los cafés solubles fueron superiores a 60,0, excepto todos los índices obtenidos en la mezcla con achicoria, C11A, que fueron inferiores a este valor.

Tabla 8.5: Índice de potencial antioxidante en los cafés solubles

Muestra	Folin Índice	CUPRAC Índice	FRAP Índice	TEAC Índice	0-fen Índice	IPA compuesto
C1R	98,3	87,6	87,7	83,0	75,5	86,4
C2R	93,1	83,0	65,1	75,6	77,4	78,9
C3R	95,7	100,0	74,4	93,4	65,5	85,8
C4R	100,0	90,1	100,0	99,2	96,4	97,1
C5R	96,9	88,5	97,9	100,0	100,0	96,7
C6R	93,4	84,6	85,2	84,3	85,0	86,5
C7D	94,1	76,7	84,3	91,4	81,1	85,5
C8D	92,2	85,0	63,1	90,4	61,3	78,4
C9D	88,8	75,8	74,3	79,7	80,6	79,8
C10V	98,7	94,4	67,4	82,2	80,9	84,7
C11A	55,5	39,7	50,9	49,0	47,5	48,5

En la tabla 8.5, se observa cómo en el café C4R se obtiene un IPA compuesto de 97,1 mientras que cómo era predecible, el menor IPA compuesto correspondió al C11A, con un valor de 48,5, situándose este valor prácticamente en la mitad los valores obtenidos por C4R y C5R.

El café soluble C4R es un café soluble puro arábica liofilizado; este proceso, al darse a bajas temperaturas, confiere al producto final una calidad superior (Farah, 2012).

El gráfico 8.5 muestra los IPA compuestos de los 11 cafés solubles analizados en orden decreciente, con un rango de índices entre 97,1 y 48,5, en el cual, como se ha mencionado anteriormente, el café soluble C4R es el de mayor índice y la mezcla achicoria-café soluble (C11A), el de menor índice, situándose el resto de los IPA compuestos de los cafés solubles entre 96,7 y 78,4.

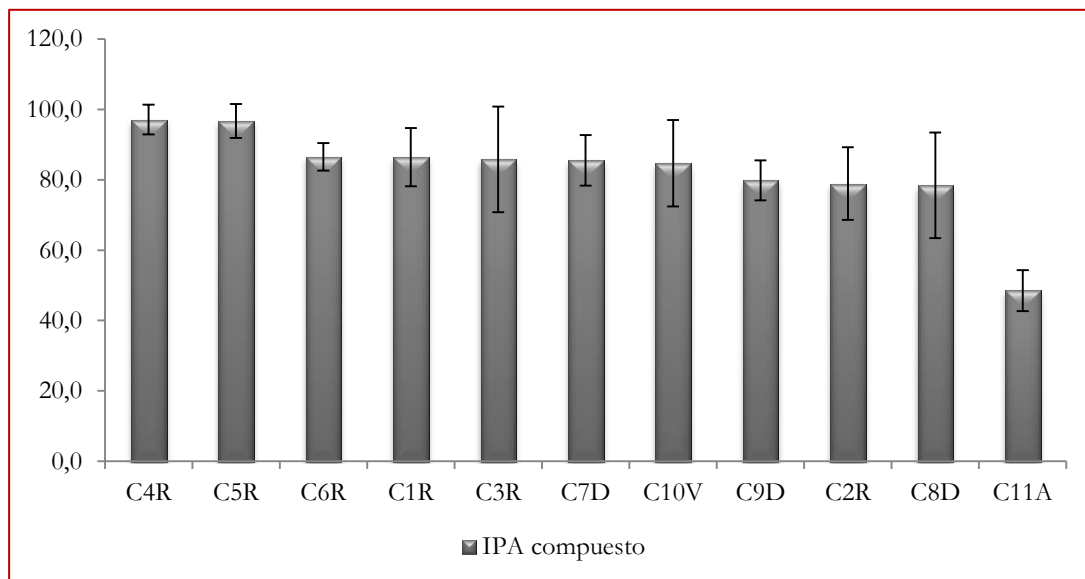


Gráfico 8.5: IPA compuesto de los cafés solubles

Análisis estadístico de los extractos de café

El estudio estadístico en la caracterización del café soluble consistió en análisis ANOVA, de cada uno de los ensayos realizados, el estudio de las correlaciones de Pearson (tabla 8.6) entre los métodos empleados y un análisis de componentes principales.

La mejor correlación obtenida entre los métodos fue la correspondiente entre los ácidos hidroxicinámicos/flavonoles 0,988 ($p < 0,01$), además las correlaciones de ambas familias con la evaluación de los polifenoles totales (FBBB), fueron superiores a 0,850. Comparando con los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante, las mejores correlaciones para los polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles fueron para todos los ensayos con el Folin seguidos en para todos ellos por el CUPRAC.

Tabla 8.6: Matriz de correlaciones de los extractos de café soluble

	FBBB	HC	Flavonoles	Ac. Acético	Ac. Quínico	Ac. Piroglutámico	Ac. Cítrico	Ac. Fumárico	Ac. Succínico	Folin	FRAP	TEAC	O- Fen	CUPRAC
FBBB	1,000 0,000	1,000 0,000												
HC	0,877 0,000	1,000 0,000												
Flavonoles	0,858 0,000	0,988 0,000	1,000 0,000											
Ac. Acético	0,688 0,000	0,660 0,000	0,682 0,000	1,000 0,000										
Ac. Quínico	0,123 0,495	0,267 0,132	0,250 0,161	0,281 0,113	1,000 0,000									
Ac. Piroglutámico	0,198 0,270	0,093 0,605	0,126 0,486	0,204 0,256	0,488 0,004	1,000 0,000								
Ac. Cítrico	0,277 0,119	0,428 0,013	0,409 0,018	0,188 0,295	0,275 0,121	0,196 0,274	1,000 0,000							
Ac. Fumárico	0,483 0,004	0,508 0,003	0,540 0,001	0,697 0,000	0,302 0,087	0,511 0,002	0,597 0,000	1,000 0,000						
Ac. Succínico	-0,793 0,000	-0,802 0,000	-0,843 0,000	-0,805 0,000	-0,425 0,014	-0,488 0,004	-0,373 0,032	-0,704 0,000	1,000 0,000					
Folin	0,792 0,000	0,868 0,000	0,899 0,000	0,754 0,000	0,480 0,005	0,434 0,012	0,306 0,084	0,623 0,000	-0,952 0,000	1,000 0,000				
FRAP	0,400 0,021	0,442 0,010	0,473 0,005	0,429 0,013	0,291 0,101	0,679 0,000	0,114 0,527	0,517 0,002	-0,570 0,001	0,648 0,000	1,000 0,000			
TEAC	0,623 0,000	0,616 0,000	0,638 0,000	0,487 0,004	0,570 0,001	0,744 0,000	0,247 0,166	0,568 0,001	-0,809 0,000	0,857 0,000	0,762 0,000	1,000 0,000		
O- Fen	0,687 0,000	0,705 0,000	0,704 0,000	0,477 0,005	0,121 0,501	0,491 0,004	0,280 0,115	0,512 0,002	-0,647 0,000	0,710 0,000	0,857 0,000	0,715 0,000	1,000 0,000	
CUPRAC	0,742 0,000	0,819 0,000	0,824 0,000	0,676 0,000	0,566 0,001	0,351 0,045	0,403 0,020	0,617 0,000	-0,863 0,000	0,907 0,000	0,500 0,003	0,792 0,000	0,539 0,001	1,000 0,000

N (33) para todas las variables empleadas. HC: Ácidos hidroxicinnámicos

Entre los ácidos orgánicos y la evaluación de la capacidad antioxidante destacó la buena correlación entre el ácido acético/Folin 0,754 ($p < 0,01$), de hecho este método de evaluación fue el que mejores correlaciones presentó con todos los ácidos, a excepción del ácido cítrico.

La mayor correlación entre los métodos de capacidad antioxidante en los cafés solubles la presentaron el Folin/CUPRAC con un valor 0,907 ($p < 0,001$), seguidos por FRAP/*O*-fenantrolina y Folin/TEAC 0,857 ($p < 0,01$), ambas parejas de métodos presentaron la misma correlación. Todas las correlaciones entre los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante son superiores a 0,700, a excepción de la presentada por FRAP/CUPRAC 0,500 ($p < 0,01$) y *O*-fen/CUPRAC 0,539 ($p < 0,01$), como se puede ver en la tabla 8.6.

Análisis de componentes principales

En los ensayos el 82,41 % de la varianza está explicada por tres componentes como se puede ver en la tabla 8.7, así el primer componente explica el 61,22 %, el segundo el 12,60 % y el tercero el 8,59 %.

Tabla 8.7: Matriz de la explicación de la varianza de los ensayos

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de varianza	% acumulado
1	8,57	61,218	61,218
2	1,764	12,6	73,817
3	1,203	8,591	82,409
4	0,948	6,771	89,18
5	0,689	4,919	94,099
6	0,337	2,409	96,509
7	0,187	1,334	97,842
8	0,133	0,948	98,79
9	0,078	0,56	99,35
10	0,043	0,309	99,66
11	0,019	0,137	99,797
12	0,017	0,12	99,917
13	0,009	0,067	99,984
14	0,002	0,016	100

Respecto a la participación de cada variable evaluada en los componentes principales que se muestra en la tabla 8.8, se observa cómo el primer componentes está definido por el Folin, CUPRAC y el contenido el flavonoles, y negativamente por el ácido succínico, mientras que el segundo componente está caracterizado positivamente por el contenido en ácido piroglutámico, el ácido quínico, FRAP y negativamente por los ácidos hidroxicinámicos, el tercer componente lo caracterizan positivamente el ácido cítrico y negativamente O-fenantrolina.

Tabla 8.8: Matriz de los parámetros evaluados en los componentes principales

	Componente		
	1	2	3
FBBB	0,828	-0,388	-0,171
HC	0,871	-0,425	-0,023
Flavonoles	0,887	-0,401	-0,041
Ácido acético (AAc)	0,764	-0,232	0,03
Ácido Quínico (AQ)	0,468	0,448	0,511
Ácido Piroglutámico (AP)	0,517	0,796	-0,035
Ácido Cítrico (AC)	0,438	-0,061	0,633
Ácido Fumárico (AF)	0,743	0,119	0,284
Ácido Succínico (AS)	-0,947	0,050	-0,052
Folin	0,967	-0,056	-0,035
FRAP	0,706	0,455	-0,42
TEAC	0,87	0,373	-0,09
O-FEN	0,793	0,089	-0,446
CUPRAC	0,901	-0,082	0,198

En los cafés solubles (tabla 8.9) todas las muestras están caracterizadas por el primer componente, a excepción de la mezcla C11A que está caracterizada por el segundo componente, este hecho se observa más claramente en la representación gráfica en el plano de los componentes principales (gráfico 8.6).

Tabla 8.9: Matriz de los componentes principales de las muestras de café soluble

	Componente		
	1	2	3
C1R	0,984	-0,084	0,042
C2R	0,944	-0,142	0,249
C3R	0,956	-0,040	-0,231
C4R	0,982	-0,011	0,029
C5R	0,977	0,010	-0,198
C6R	0,974	-0,060	0,183
C7D	0,969	0,013	-0,239
C8D	0,991	-0,016	-0,048
C9D	0,969	-0,036	0,104
C10V	0,965	-0,123	0,071
C11A	0,584	0,807	0,071

En el gráfico 8.6, se observa claramente cómo, a excepción de la mezcla C11A, todas las muestras analizadas son similares, tanto en capacidad antioxidante, como en contenido en familias polifenólicas, polifenoles totales y ácidos orgánicos.

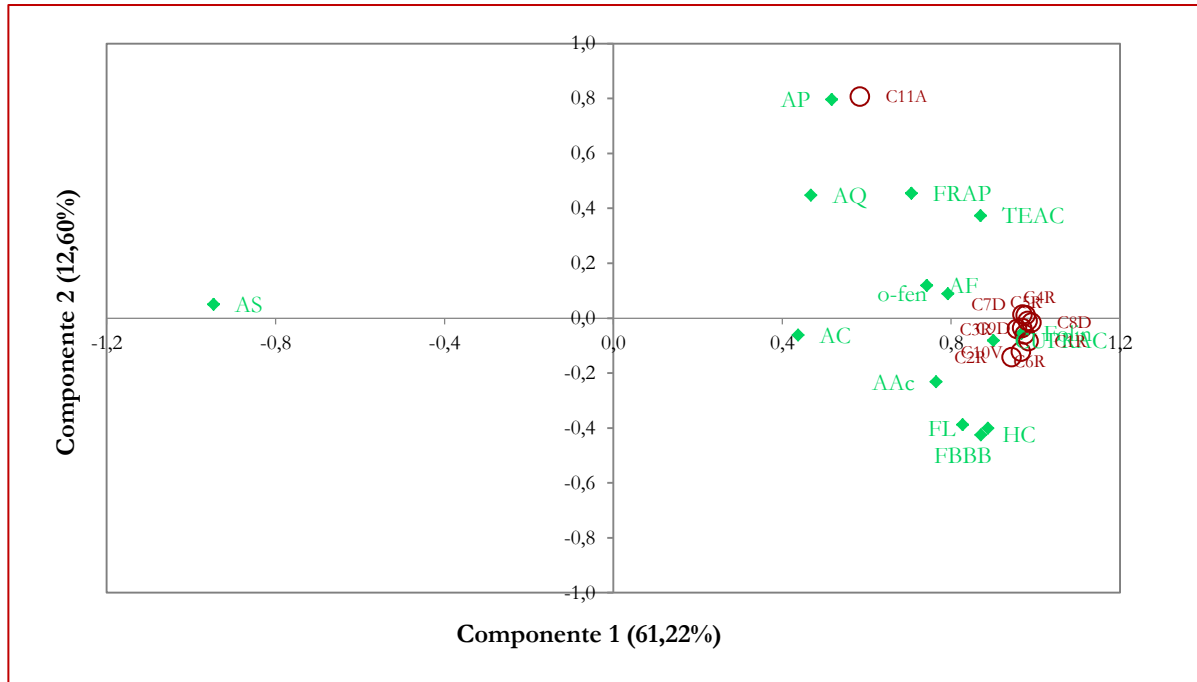


Gráfico 8.6: Superposición de los análisis de componentes principales de las muestras y ensayos en el café soluble

Observando el gráfico 8.6, todos los cafés solubles analizados se sitúan en la misma zona del gráfico que los ensayos CUPRAC y Folin que caracterizan a los cafés solubles excepto a la mezcla C11A, que se encuentra cercana al ácido piroglutámico y al FRAP, que son los ensayos que caracterizan al segundo componente.

8.4.2. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en los dializados de café soluble

La caracterización de los dializados consistió en la evaluación de las familias polifenólicas, en la identificación de sus ácidos orgánicos y en la capacidad antioxidante de los dializados, todos sus resultados se expresaron en función de 100 g de café soluble.

Familias polifenólicas en los dializados

La evaluación de las familias polifenólicas en los dializados se llevó a cabo según el procedimiento empleado para los extractos de café para la determinación de ácidos hidroxycinámicos y flavonoles (6.5.2), salvo que la cantidad de muestra dializada fue de 500 µl.

En las muestras dializadas se llevó a cabo la determinación del contenido en ácidos hidroxycinámicos y flavonoles cuyos resultados se detallan en la tabla 8.10.

Tabla 8.10: Cantidad de familias polifenólicas en los dializados expresados en 100 g de café soluble

Muestra	Hidroxicinámicos	Flavonoles
	(g ácido ferúlico/100 g)	(g quercetina/100 g)
C1R	$1,45 \pm 0,07^d$	$1,38 \pm 0,06^d$
C2R	$2,17 \pm 0,01^i$	$2,32 \pm 0,06^i$
C3R	$1,39 \pm 0,06^{cd}$	$1,22 \pm 0,05^c$
C4R	$1,84 \pm 0,01^g$	$1,76 \pm 0,07^g$
C5R	$1,76 \pm 0,04^f$	$1,78 \pm 0,06^g$
C6R	$1,66 \pm 0,05^e$	$1,67 \pm 0,06^f$
C7D	$1,35 \pm 0,04^c$	$1,25 \pm 0,03^c$
C8D	$1,24 \pm 0,05^b$	$1,14 \pm 0,05^b$
C9D	$1,60 \pm 0,04^e$	$1,58 \pm 0,03^e$
C10V	$2,04 \pm 0,09^h$	$2,22 \pm 0,09^h$
C11A	$0,79 \pm 0,02^a$	$0,67 \pm 0,02^a$

De igual manera que en el café soluble el menor valor obtenido fue el del café C11A, en cambio los resultados más altos se obtuvieron en ambas familias por el café C2R, que correspondía en los ácidos hidroxicinámicos del extracto de café al segundo valor más alto este café soluble concretamente es un café soluble puro arábica.

Ácidos orgánicos en los cafés solubles dializados

La determinación de los ácidos orgánicos en los dializados, se llevó a cabo por el método 6.3, la única diferencia con los extractos fue que los dializados necesitaron una acidificación previa, para ello se añadieron 20 µl de H₂SO₄ 9M, a 5 ml de muestra dializada.

En la tabla 8.11 se muestra el contenido de los ácidos orgánicos tras la digestión *in vitro* y la diálisis posterior (dializado), en función de 100 g de café soluble. En general se observa que todos los perfiles de ácidos orgánicos son similares a los obtenidos en los cafés solubles a excepción de los dializados de las muestras C4R, C5R, y C8D, en las que no se ha detectado ácido cítrico.

Al observar la tabla 8.11 destaca cómo el ácido mayoritario en todos los dializados de café soluble fue el ácido acético, en algún caso como el C6R con una concentración de 5 g ácido acético/100 g, seguidos por el ácido piroglutámico y el ácido quínico

Las concentraciones del ácido acético y del ácido quínico en algunas muestras, como C7D y C11A en el ácido acético, y C4R y C8D en el ácido quínico, son mayores que las de estos ácidos en sus respectivos extractos.

El incremento de la concentración del ácido acético después de la digestión y diálisis, puede ser debido a que el ácido acético es un ácido de dos carbonos y podría ser un producto de la digestión de otros ácidos como por ejemplo el ácido cítrico, ya que este último ácido es el que menor concentración, en general, ha presentado en los dializados con respecto al café soluble.

En el caso del quínico una de las razones más probables de este incremento en su contenido se deba principalmente a la digestión de los ácidos clorogénicos, ya que estudios *in vivo* sugieren que los ácidos clorogénicos se hidrolizan en ácido caféico (o sus isómeros) y ácido quínico (Suri y Crozier, 2012). Esta cantidad detectada en quínico en las muestras dializadas es importante porque el ácido quínico se considera un inductor antioxidante a través del metabolismo de la nicotinamida y el triptófano (Pero et al. 2009; Pero and Lund, 2011).

Tabla 8.11: Contenido en ácidos orgánicos en muestras dializadas, expresados en mg ácido por 100 g café soluble

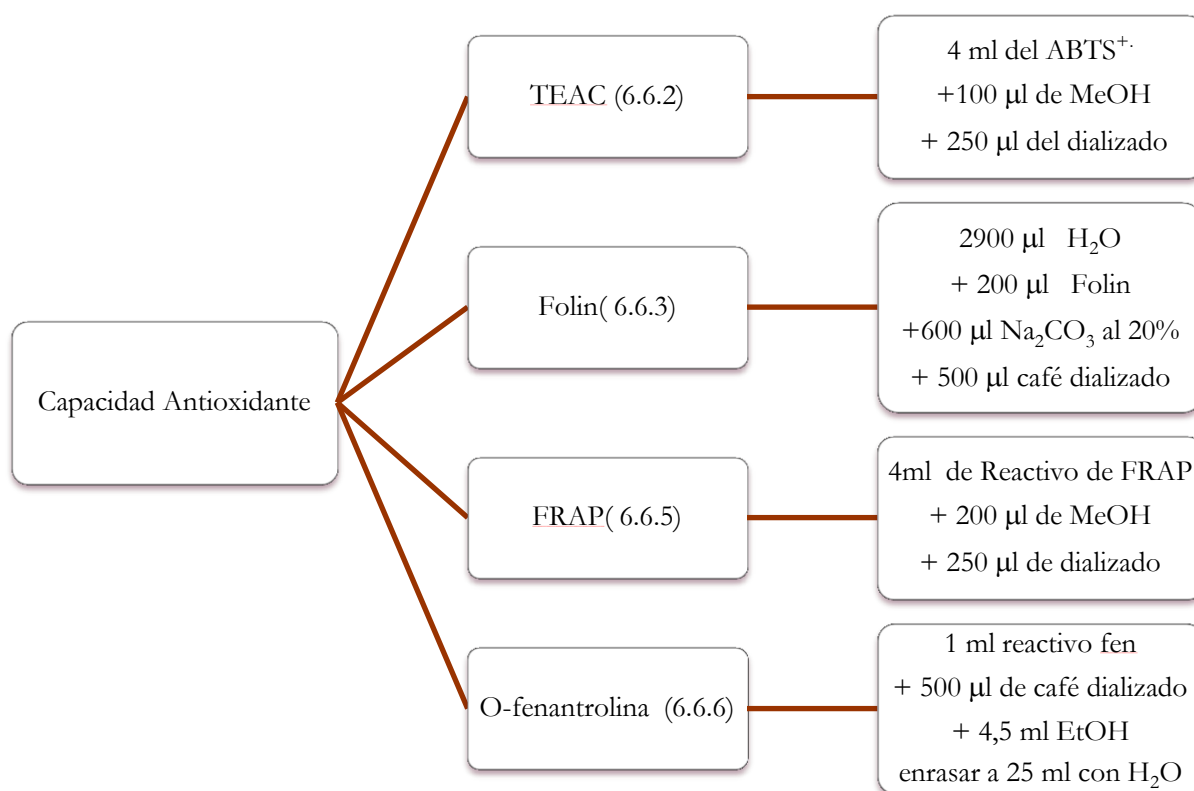
Muestra	Quínico	Acético	Piroglutámico	Cítrico	Fumárico	Succínico
C1R	1856,93 ± 210,41 ^{bcd}	4496,15 ± 201,78 ^{cd}	2628,28 ± 295,50 ^{de}	415,82 ± 46,06 ^a	25,37 ± 1,24 ^b	n.d
C2R	1812,76 ± 155,46 ^{bc}	4544,70 ± 731,84 ^{cd}	1978,50 ± 33,47 ^{bc}	651,34 ± 25,15 ^b	23,86 ± 0,75 ^b	n.d
C3R	1474,54 ± 136,69 ^{ab}	3663,70 ± 198,48 ^b	2342,82 ± 160,04 ^{cd}	1483,42 ± 101,33^f	28,21 ± 1,82 ^b	n.d
C4R	2409,63 ± 335,44 ^{cde}	3739,87 ± 367,01 ^b	3056,04 ± 291,13 ^f	n.d	26,32 ± 0,37 ^b	n.d
C5R	1443,98 ± 60,56 ^{ab}	3597,23 ± 335,36 ^b	2697,83 ± 166,81 ^{def}	n.d	21,79 ± 2,32 ^b	n.d
C6R	2275,26 ± 238,67 ^{cde}	5091,50 ± 464,71^d	2360,01 ± 209,41 ^{de}	856,17 ± 124,23 ^d	34,67 ± 1,28 ^c	n.d
C7D	2803,28 ± 575,47 ^c	4900,95 ± 757,72 ^{cd}	2703,39 ± 366,89 ^{def}	664,86 ± 79,63 ^b	29,22 ± 1,19 ^b	n.d
C8D	4228,52 ± 643,69^f	4265,29 ± 180,61 ^{bc}	2663,16 ± 348,32 ^{ef}	n.d	25,40 ± 1,52 ^b	n.d
C9D	2673,04 ± 149,69 ^c	3694,28 ± 91,83 ^b	3694,28 ± 91,83^g	913,86 ± 74,17 ^d	46,88 ± 5,20^c	n.d
C10V	2434,84 ± 118,65 ^{de}	3645,72 ± 47,61 ^b	1773,04 ± 176,38 ^b	764,19 ± 80,29 ^{bc}	24,33 ± 1,76 ^b	n.d
C11A	911,92 ± 121,00 ^a	2410,25 ± 365,49 ^a	1188,41 ± 189,91 ^a	351,08 ± 21,80 ^a	5,69 ± 0,42 ^a	234,85 ± 82,68^a

n.d: No detectado. Letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas.

Capacidad antioxidante en los cafés solubles dializados

La capacidad antioxidante evaluada en los dializados se realizó por cuatro métodos, Folin, FRAP, TEAC y *O*-fenantrolina (*o*-fen). Los resultados, recogidos en la tabla 8.11, para el método Folin se expresaron en g ácido gálico/100 g café soluble y para los otros tres métodos en mmol trolox equivalente/100 g de café soluble. Los procedimientos empleados en las muestras dializadas se describen en el esquema 8.4.

Esquema 8.4: Metodología empleada en la evaluación de la capacidad antioxidante de los dializados



Los resultados de la capacidad antioxidante evaluada en los dializados se muestran en la tabla 8.12, lo primero que destaca es que la capacidad antioxidante de los dializados valorada por cada uno de los métodos indicados, representa alrededor del 40 % del valor de la capacidad antioxidante, encontrada en sus correspondientes cafés solubles (tabla 8.4).

Tabla 8.12: Capacidad antioxidante en muestras dializadas de café soluble, expresada en 100 g de café soluble

Muestra	Folin	FRAP	TEAC	0-fen
	g gálico/100 g	mmol TE/100 g	mmol TE/100 g	mmol TE/100 g
C1R	$3,22 \pm 0,02^{cd}$	$13,64 \pm 0,78^e$	$24,83 \pm 1,16^c$	$24,05 \pm 1,56^c$
C2R	$3,56 \pm 0,12^g$	$14,48 \pm 1,13^f$	$23,43 \pm 0,66^b$	$31,93 \pm 6,76^d$
C3R	$3,28 \pm 0,09^c$	$14,78 \pm 0,76^{fg}$	$23,36 \pm 0,59^b$	$7,96 \pm 2,44^a$
C4R	$3,68 \pm 0,02^h$	$13,31 \pm 1,23^e$	$23,45 \pm 0,76^b$	$25,82 \pm 7,42^c$
C5R	$3,63 \pm 0,04^{gh}$	$15,46 \pm 0,13^g$	$31,48 \pm 0,80^e$	$30,59 \pm 7,24^d$
C6R	$3,34 \pm 0,06^e$	$14,91 \pm 0,35^{fg}$	$28,10 \pm 1,17^d$	$26,17 \pm 2,63^c$
C7D	$3,30 \pm 0,16^{de}$	$10,49 \pm 0,19^c$	$23,30 \pm 1,01^b$	$35,48 \pm 3,16^e$
C8D	$3,03 \pm 0,06^b$	$9,01 \pm 0,17^b$	$22,39 \pm 0,43^b$	$11,68 \pm 2,31^b$
C9D	$3,37 \pm 0,07^f$	$11,89 \pm 0,08^d$	$22,54 \pm 0,40^b$	$29,91 \pm 4,39^d$
C10V	$3,81 \pm 0,09^i$	$17,19 \pm 0,08^h$	$33,29 \pm 1,11^f$	$40,17 \pm 6,46^f$
C11A	$1,78 \pm 0,07^a$	$6,88 \pm 0,19^a$	$11,48 \pm 0,95^a$	$8,45 \pm 2,63^a$

Letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas.

Los dializados de café con mayor capacidad antioxidante en todos los ensayos, son al igual que en los extractos de café soluble, los correspondientes a la mezcla con café verde (C10V). Asimismo, la menor capacidad antioxidante corresponde a la mezcla con achicoria (C11A) en todos los ensayos, excepto en el de la o-fenantrolina en el que el dializado de café regular C3R no se diferencia significativamente del correspondiente a la muestra C11A.

8.4.3. Evaluación de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos

Se evaluó la bioaccesibilidad *in vitro* de familias polifenólicas, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, de los ácidos orgánicos y de la capacidad antioxidante.

Este ensayo *in vitro* proporciona información sobre los componentes solubles y potencialmente disponibles para la absorción, además proporcionan datos útiles que permiten establecer comparaciones entre los alimentos (Cilla, 2010).

En los alimentos una vez producida la digestión *in vitro* y su diálisis posterior, se liberarán por parte de las enzimas digestivas compuestos potencialmente disponibles, por lo que interesa conocer la capacidad antioxidante de estos compuestos liberados (Ramírez-Moreno, 2011).

Para no confundir la bioaccesibilidad con la biodisponibilidad, la bioaccesibilidad se define como la cantidad de un constituyente alimentario que está presente en el intestino como consecuencia de la liberación de ese componente desde la matriz alimentaria, y puede ser capaz de pasar la barrera intestinal (Saura-Calixto et al. 2007).

La biodisponibilidad de un nutriente o compuesto bioactivo está caracterizada por la proporción del mismo dado en un alimento o dieta el cual el organismo pueda utilizar, por lo tanto la biodisponibilidad engloba la absorción y transporte de compuestos por el organismo también como su conversión en especies biológicamente activas (Benito y Miller, 1998). Esto quiere decir que la bioaccesibilidad de un nutriente o compuesto bioactivo es la primera etapa para evaluar la biodisponibilidad.

De hecho, la bioaccesibilidad está influenciada por la digestión de la matriz alimentaria, por los efectos sinérgicos y antagónicos de sus distintos componentes, pero también está influenciada por las propiedades fisicoquímicas como pH, temperatura y textura del alimento (Rein et al. 2013).

Para calcular la bioaccesibilidad de los compuestos estudiados y de la capacidad antioxidante se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ bioaccesibilidad} = \frac{[\text{sustancia dializada}]}{[\text{sustancia no digerida}]} * 100$$

Ecuación 8.1: Cálculo de la bioaccesibilidad (Rodríguez-Roque et al. 2014)

En los cafés solubles se puede observar para los ácidos hidroxicinámicos una bioaccesibilidad entre un 20 a un 30 % y para los flavonoles entre un 17 a un 33 % (gráfico 8.7).

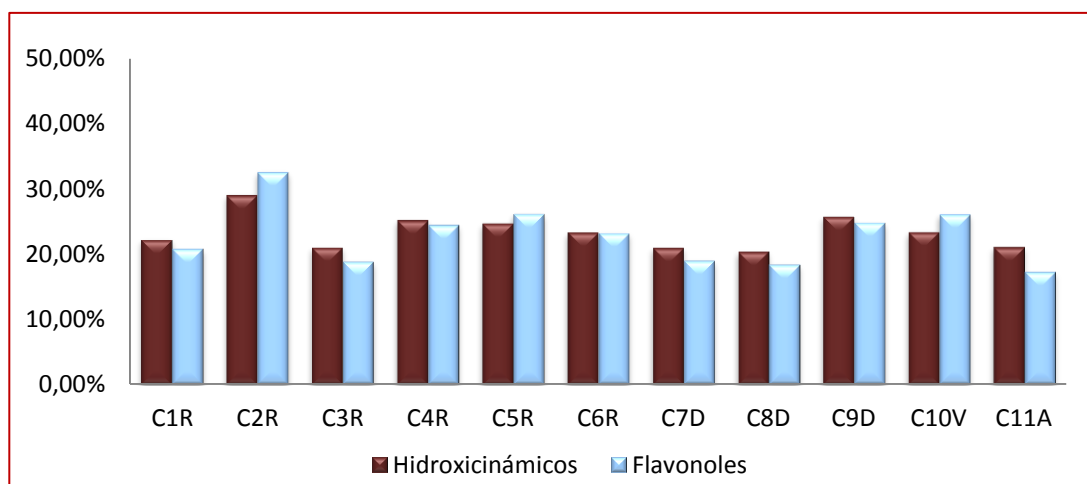


Gráfico 8.7: Bioaccesibilidad de las familias polifenólicas

La mayor bioaccesibilidad en ambas familias polifenólicas la mostró la muestra C2R, este café soluble regular en su etiquetado especifica la variedad empleada en su obtención es café arábica, la que tras la diálisis se encontraron mayores concentraciones de ácidos hidroxicinámicos (2,17 g ácido ferúlico/100 g) y flavonoles (2,32 g quercetina/100 g café soluble).

En general los ácidos orgánicos (gráfico 8.7) determinados presentan una alta bioaccesibilidad. El ácido que menor bioaccesibilidad presentó fue el ácido fumárico con valores entre un 23 % y un 62 %.

En el gráfico 8.8 se aprecia claramente como la bioaccesibilidad tanto del ácido succínico, cítrico y fumárico se sitúan de media por debajo del 50 %, mientras que el ácido piroglutámico se sitúa ligeramente por encima del 50 %, y la bioaccesibilidad de los ácidos acético y quínico se sitúan en todas las muestras por encima del 50 %.

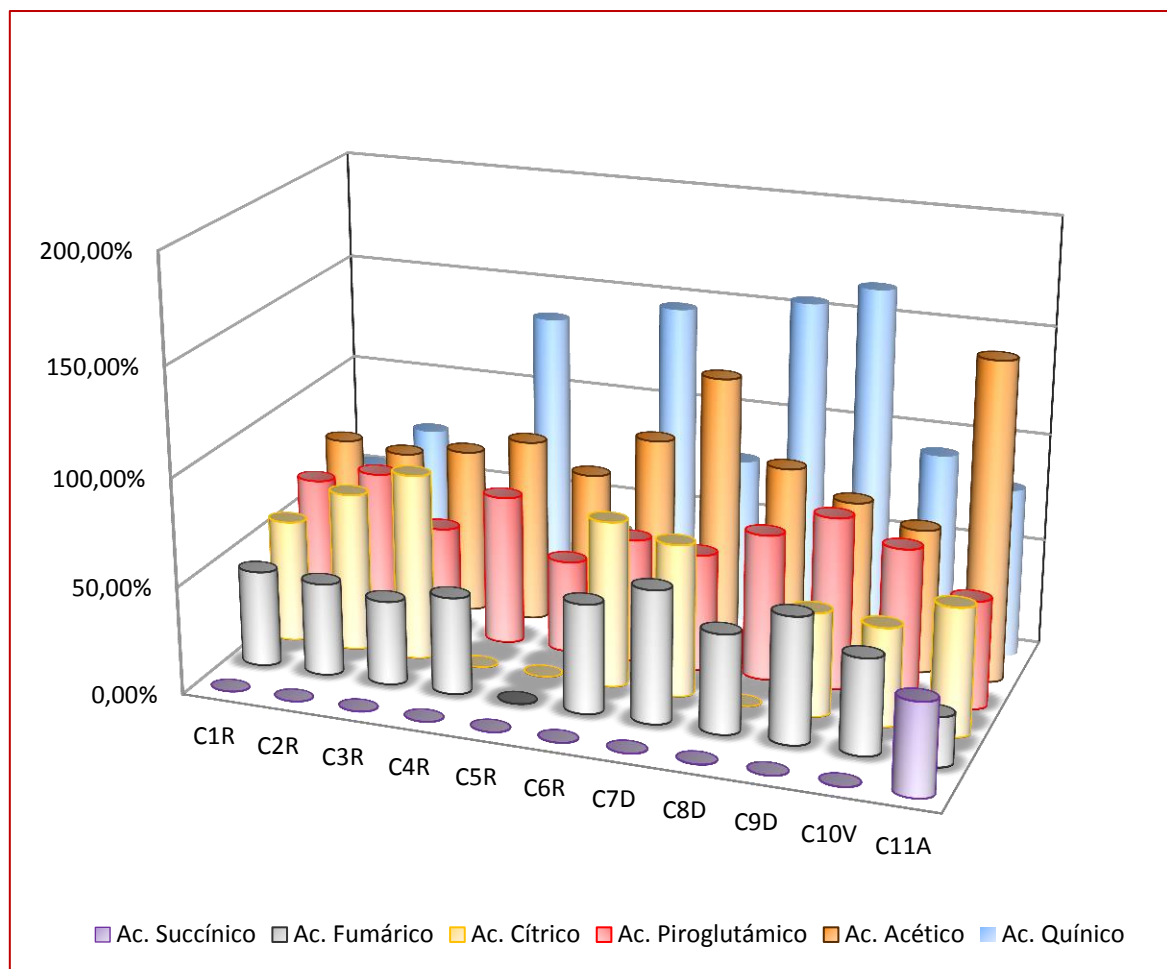


Gráfico 8.8: Bioaccesibilidad de los ácidos orgánicos en los cafés solubles

La bioaccesibilidad que presentan el ácido acético y el ácido quínico corresponde a unos valores medios del 93 %. De hecho para el ácido quínico cuatro cafés solubles presentaron una bioaccesibilidad superior al 100 % (C4R, C5R, C8D y C9D), en el caso del ácido acético fueron dos, C7D y C11A.

:

La muestra C10V es la que presenta mayor bioaccesibilidad en todos los ensayos de capacidad antioxidante con valores de 24, 31, 27 y 36 % para Folin, FRAP, TEAC y O-fenantrolina, respectivamente, hecho que se observa claramente en el gráfico 8.9.

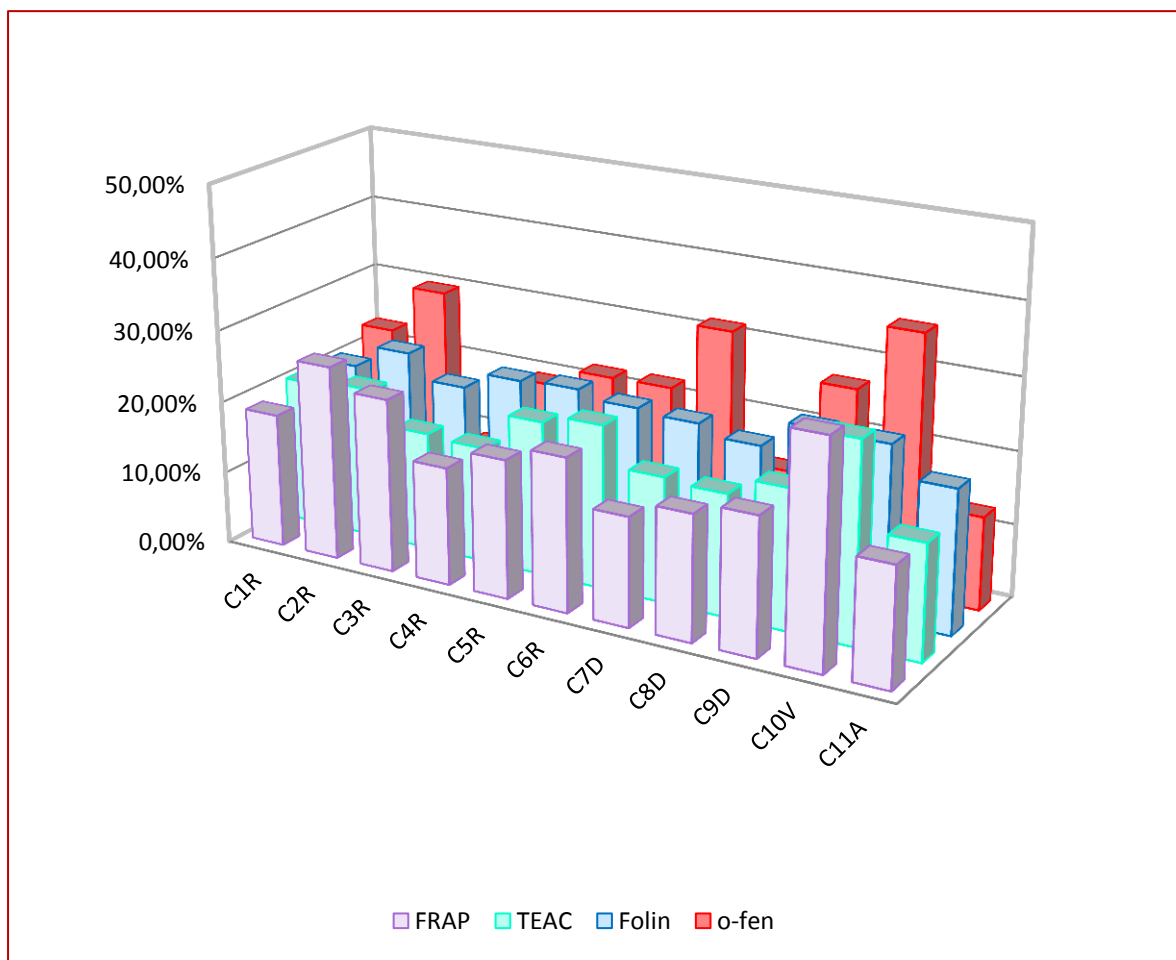


Gráfico 8.9: Bioaccesibilidad de la capacidad antioxidante

8.5. CONCLUSIONES PARCIALES

- El contenido encontrado de polifenoles totales en las muestras de café soluble analizadas se situó entre 15,99 y 8,99 g de ácido gálico/100 g correspondiente a las mezclas de café verde-café tostado y achicoria-café soluble, respectivamente.
- Los ácidos mayoritarios en todos los cafés analizados fueron los ácidos acético, piroglutámico y quínico, excepto en la mezcla achicoria-café donde destacó el contenido de ácido succínico con 3,29 g de ácido succínico/100g café soluble.
- La concentración media del ácido acético, en todos los cafés solubles, incluyendo la mezcla verde-tostado fue de 4,9 g ácido acético/100 g, para el ácido piroglutámico 4,0 g/100 g y bastante menor para el ácido quínico, de 2,9 g de ácido quínico/100 g de café soluble.
- La mezcla de café soluble con un 35% de café verde enriquece la bebida preparada con ella en polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, respecto al resto de cafés analizados. Sin embargo, la mezcla con un 60% de achicoria, implica una disminución de todos los compuestos bioactivos y de la capacidad antioxidante con respecto a los cafés solubles.
- La mayor capacidad antioxidante, obtenida mediante el índice de potencial antioxidante compuesto, correspondió a un café puro arábica liofilizado. En general, los cafés regulares destacaron sobre los cafés descafeinados en lo referente a este parámetro, lo que parece apuntar hacia la importancia que tienen los tratamientos tecnológicos en la preservación el potencial antioxidante de los componentes del café.
- La digestión *in vitro* y su diálisis posterior, provocó una disminución significativa de los ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, lo que implica una disminución de la capacidad antioxidante en los dializados, si bien la presencia de café verde en la mezcla con café tostado, incrementó la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes, respecto al resto de cafés analizados.
- El perfil de ácidos orgánicos no se vio modificado tras la digestión y diálisis de las bebidas de café, con la única excepción del ácido cítrico, que no se encontró en el dializado correspondiente a tres de los cafés estudiados.

- Destaca principalmente la alta bioaccesibilidad de los ácidos orgánicos comparada con la obtenida para las familias polifenólicas y la capacidad antioxidante, ya que para algunos ácidos (concretamente el ácido quínico y el ácido acético) fue superior al 90% en varios cafés solubles.

9. ZUMOS

Los zumos de frutas y hortalizas son agradables y muy nutritivos. Aportan a la dieta nutrientes que nuestro organismo necesita para mantenerse sano como el agua, vitaminas y minerales, fibra y azúcares. Se caracterizan además por su bajo contenido de proteínas y grasas. Algunos nutrientes están presentes en cantidades similares o levemente inferiores a los frutos de partida tales como vitaminas, minerales, oligoelementos, azúcares y otros están presentes en cantidades menores, como las fibras de la fruta debido a su eliminación durante la centrifugación y filtración (Plumey et al. 2013).

Los zumos están compuestos aproximadamente por un 90 % de agua y su segundo componente mayoritario son los hidratos de carbono. Éstos constituyen el 75 al 85 % de los sólidos solubles, destacando sacarosa, glucosa y fructosa, ya que son los mayoritarios presentes en las frutas. También pueden aparecer maltosa, xilosa y sorbitol (Huang et al. 2009).

Los zumos contienen una pequeña cantidad de proteínas y minerales. Tienen una baja concentración de sodio (valor medio, 1 mg/100 ml), así como de calcio (entre 5 y 15 mg/100 ml). El contenido medio en potasio es de 140 mg/100 ml (Tojo Sierra et al. 2003).

Los ácidos orgánicos influyen en las características organolépticas de los zumos y en su estabilidad microbiológica (Leopold et al. 2006), además representan alrededor del 1 % del peso total de un zumo. La cantidad de ácido presente en los zumos puede variar dependiendo de la variedad de la fruta empleada, de la estación, del procesado y del tiempo de almacenamiento (Huang et al. 2009).

En los zumos los principales ácidos orgánicos son en el caso del zumo de naranja, el cítrico, el málico en el zumo de manzana y el ácido tartárico en el zumo de uva (Huang et al. 2009). En otros zumos de frutas han sido detectados otros ácidos orgánicos como el ácido lactoisocítrico (lactona del ácido isocítrico) en el zumo de mora (Fan-Chiang y Wrolstad, 2010).

Los ácidos orgánicos juegan un papel fundamental en los ensayos de autenticación de los zumos (Huang et al. 2009; Ehling y Cole, 2011). Los ratios entre los diferentes ácidos orgánicos que componen el perfil de cada fruta son específicos de cada una de ellas, lo que permite detectar la adulteración de un zumo (Nour et al. 2010).

Presentan además vitaminas hidrosolubles, aromas, carotenoides y sustancias bioactivas (International Federation of Fruit Juice Producers, IFU, 2012).

En zumos frescos de frutas cítricas se han determinado valores de vitamina C comprendidos en mandarina entre 35 a 41,3 mg ácido ascórbico/100 ml, en zumo de pomelo 26,7 a 78 mg ácido ascórbico/100 ml, en zumo de limón entre 19,5 a 57,3 mg ácido ascórbico/100 ml y en zumo de naranja se ha detectado más de 35 a 78 mg ácido ascórbico/100 ml (Martí et al. 2009). De hecho, Royo-Bordonada et al. (2003) considera que los zumos de fruta junto con los cítricos representan el 43 % de la ingesta de vitamina C en los niños españoles.

El zumo de naranja además es fuente de carotenoides como α y β -caroteno, α -criptoxantina, zeaxantina y luteína (Sánchez-Moreno et al. 2003).

Asimismo, los zumos de frutas contienen polifenoles derivados de las frutas de las que provienen. Entre las distintas familias de polifenoles destacan las flavanonas en zumo de naranja (Crozier et al. 2010), elagitaninos en zumo de granada (Borges et al. 2010), antocianinas en uva tinta, grosellas negras y cerezas (Fröhling et al. 2012).

Una de las tendencias de los últimos años ha sido la elaboración de zumos a partir de la mezcla de varias frutas que, además de mejorar las características nutricionales de los productos, proporcionan un incremento de las concentraciones de algunos compuestos bioactivos, añadiendo nuevos nutrientes o mejorando su sabor y apariencia (Rodríguez-Roque et al. 2013).

En general, su contenido calórico oscila entre 40 y 50 Kcal/100 ml, por lo que un vaso de zumo proporciona unas 100 Kcal (Cámara et al. 2011).

Normativa aplicable a los zumos

Según la Directiva 2012/12/UE y el Real Decreto 781/2013, por el cual se transcribe esta directiva a la legislación española, se definen las siguientes categorías de productos dirigidas al consumidor final:

- **Zumo de frutas**

El producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de las partes comestibles de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por refrigeración o congelación, de una o varias especies mezcladas, que posea el color, el aroma y el sabor característicos del zumo de la fruta de la que procede.

Se podrán reincorporar al zumo el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta.

En el caso de los cítricos, el zumo de frutas procederá del endocarpio. No obstante, el zumo de lima podrá obtenerse a partir del fruto entero.

Cuando los zumos se obtengan a partir de frutas que incluyan pepitas, semillas y pieles, no se incorporarán en el zumo partes o componentes de las pepitas, las semillas o la piel. La presente disposición no se aplicará a los casos en que las partes o los componentes de las pepitas, las semillas o la piel no puedan eliminarse mediante las buenas prácticas de fabricación.

Se autoriza la mezcla de zumos de frutas y de puré de frutas en la producción del zumo de frutas.

- **Zumo de frutas a partir de concentrado**

El producto obtenido al reconstituir zumo de frutas concentrado definido, a continuación, con agua potable que cumpla los criterios establecidos en la Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.

El contenido de sólidos solubles del producto acabado debe satisfacer el valor mínimo de °Brix para el zumo reconstituido, especificado en la tabla 9.1.

Si un zumo a partir de concentrado se elabora con una fruta no mencionada en la tabla 9.1, el nivel mínimo de °Brix del zumo reconstituido corresponderá al nivel de °Brix del zumo extraído de la fruta utilizada para elaborar el concentrado.

Tabla 9.1 Nivel mínimo de grados Brix en los zumos

Nombre común de la fruta	Nombre Científico	°Brix
Manzana (*)	<i>Malus domestica</i> Borkh.	11,2
Albaricoque (**)	<i>Prunus armeniaca</i> L.	11,2
Plátano (**)	<i>Musa. paradisiaca</i> (con exclusión de los plátanos hortaliza)	21,0
Grosella negra (*)	<i>Ribes nigrum</i> L.	11,0
Uva (*)	<i>Vitis Vinifera</i> L. o sus híbridos <i>Vitis Labrusca</i> o sus híbridos	15,9
Pomelo (*)	<i>Citrus paradisi</i> Macfad.	10,0
Guayaba (**)	<i>Psidium guajava</i> L.	8,5
Limón (*)	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	8,0
Mango (**)	<i>Mangifera indica</i> L.	13,5
Naranja (*)	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.	11,2
Fruto de la pasión (*)	<i>Passiflora edulis</i> . Sims	12,0
Melocotón (**)	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. Persica	10,0
Pera (**)	<i>Pyrus communis</i> L.	11,9
Piña (*)	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr	12,8
Frambuesa (*)	<i>Rubus idaeus</i> L.	7,0
Cereza agria (*)	<i>Prunus cerasus</i> L.	13,5
Fresa (*)	<i>Fragaria x. ananassa</i> Duch.	7,0
Tomate (*)	<i>Lycopersicum esculentum</i> L.	5,0
Mandarina (*)	<i>Citrus reticulata</i> Blanco.	11,2
*Producidos como zumos, se determinará una densidad relativa mínima en relación con el agua a 20°C/ 20 °C.		
**Producidos como purés, solamente se determinará un valor mínimo °Brix sin corregir (sin corrección de la acidez).		

Anexo V de la Directiva 2012/112/CE del parlamento y consejo europeo del 19 de abril de 2012 por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

Se podrán reincorporar al zumo de frutas a partir de concentrado el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta.

El zumo de frutas a partir de concentrado se preparará según procesos de fabricación apropiados que mantengan las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de un tipo medio de zumo de la fruta de la que procede.

La mezcla de zumos de frutas y/o de zumos de frutas concentrados y de puré de frutas y/o de puré de frutas concentrado está autorizada para la producción de zumo de frutas a partir de concentrado.

En esta directiva también se definen las siguientes categorías que no están destinadas al consumidor final.

- **Zumo de frutas concentrado**

El producto obtenido a partir de zumo de una o varias especies de fruta por eliminación física de una parte determinada del agua. Cuando el producto esté destinado al consumo directo, la eliminación de agua será de al menos un 50 %.

Se podrán reincorporar al zumo de frutas concentrado el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta.

- **Zumo de fruta extraído con agua**

El producto obtenido por difusión en agua de:

- Fruta pulposa entera cuyo zumo no puede extraerse por procedimientos físicos,
- Fruta entera deshidratada.

- **Zumo de frutas deshidratado/en polvo**

El producto obtenido a partir de zumo de una o varias especies de fruta por eliminación física de la práctica totalidad del agua.

- **Néctar de frutas**

El producto susceptible de fermentación, pero no fermentado que se obtenga por adición de agua con o sin adición de azúcares y/o de miel a los productos definidos a continuación, al puré de frutas, y/o al puré de frutas concentrado, y/o a una mezcla de estos productos, que se definen a continuación, están recogidos en el anexo II de la Directiva europea 2012/12/UE.

- **Puré de frutas:** El producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido mediante procedimientos físicos adecuados, por ejemplo tamizando, triturando o desmenuzando la parte comestible de frutas enteras o peladas sin eliminar el zumo.
- **Puré de frutas concentrado:** El producto obtenido a partir del puré de frutas por eliminación física de una proporción determinada del agua que lo constituye. El puré de frutas concentrado podrá contener aromas reconstituidos mediante procedimientos físicos apropiados, definidos en el anexo I, parte II, punto 3, que deberán proceder de la misma especie de fruta.

Sin perjuicio de lo dispuesto en el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, en el caso de la fabricación de néctares de frutas sin azúcares añadidos o con valor energético reducido, los azúcares se podrán sustituir total o parcialmente por edulcorantes de conformidad con el Reglamento (CE) 1333/2008.

Se podrán reincorporar al néctar de frutas el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta.

Además al añadirse agua, tanto a los zumos elaborados a partir de concentrado como a los néctares, el agua está regulada por Real Decreto 140/2003.

El nivel mínimo de contenido de zumo o puré requerido para la elaboración de los néctares de fruta se recoge en la tabla 9.2.

Tabla 9.2: Nivel mínimo de contenido de zumo o puré para la elaboración de néctares de fruta

Néctares de frutas a partir de:		Contenido mínimo de zumo y/o puré (% de volumen de producto)
I. Frutas de zumo ácido no consumibles en estado natural		
Granos de sauco		50
Arándanos o mirtillos, agavanzas, membrillos, otras cerezas, fresas frambuesas		40
Cerezas acidas		35
Arándanos rojos, serbas, grosellas silvestres, endrinas, ciruelas, ciruelas silvestres, moras		30
Hierba de mora de Quito, grosellas rojas, grosellas negras, grosellas blancas, fruto de la pasión, <i>seabuckthron</i> (espinosa amarilla), limones y limas, otras frutas que pertenezcan a esta categoría		25
II. Frutas pobres en ácido o con mucha pulpa o muy aromatizadas, con zumo no consumible en estado natural		
Mangos, plátanos, guayabas, papayas lichis, acerolas, guanabanas, corazón de buey o cachimán, chirimoyas, granadas, anacardos, cajas, imbu, otras frutas que pertenezcan a esta categoría		25
III. Frutas de zumo comestibles en estado natural		
Manzana, pera, melocotones, cítricos (salvo limones y limas), piñas, tomates, otras frutas que pertenezcan a esta categoría		50

Adaptación procedente del Anexo IV de la Directiva 2012/112/CE del parlamento y consejo europeo del 19 de abril de 2012 por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

Consumo de los zumos y néctares

El panel de consumo del MAGRAMA, (2015) diferencia entre las distintas categorías de zumos y néctares; entre ellas destaca claramente el zumo procedente de concentrado (33 %), repartido entre el 17 % correspondiente a los zumos procedentes de concentrado y el 16 % correspondiente a los zumos enriquecidos. Teniendo en cuenta sólo el consumo de zumos, en el año 2014, el zumo procedente de concentrado sigue siendo el tipo de zumo más consumido por los españoles.

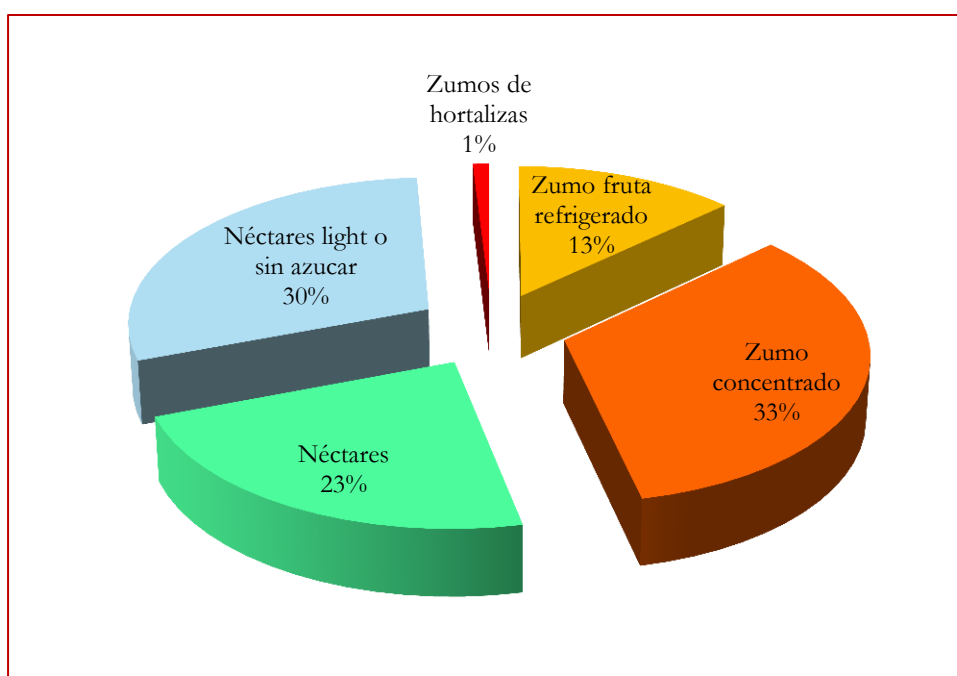


Gráfico 9.1: Consumo según tipo de productos de zumos y néctares 2014. Elaboración propia con datos de MAGRAMA, (2015)

Un hecho que destaca en el consumo de zumos y néctares (gráfico 9.1), respecto a los néctares, son los néctares "light" o sin azúcar, cuya categoría individual es la más consumida, superan a los néctares tradicionales. En el caso de los zumos refrigerados su consumo se ha incrementado un 4 % con respecto al año 2012, cuya media *per cápita* se situaba en 1,14 l persona/año mientras que en el 2014 este consumo se situó en 1,43 l persona/año (MAGRAMA, 2015).

En la actualidad, las directrices del mercado del zumo están orientadas a la salud y el bienestar; de este modo los consumidores elegirán productos que ofrezcan no solo un alto valor nutricional sino también beneficios añadidos, como es la fortificación con vitaminas y minerales, y la funcionalidad de los compuestos naturales (Padilla-Zakour et al. 2012).

Un importante segmento de los "alimentos funcionales", en relación a sus propiedades antioxidantes, son las bebidas enriquecidas, bebidas que han sido fortificadas con vitaminas A, C y E (conocidas como bebidas ACE) u otros ingredientes funcionales, aunque es un segmento pequeño en el mercado actual europeo, ocupando entre un 7 y 8 % del mercado de las bebidas no alcohólicas durante los años 2004 y 2005 (Siro et al. 2008).

En la Unión Europea el mercado de zumos y néctares en el 2011 ha seguido descendiendo por tercer año consecutivo debido a la situación económica, aunque esta caída ha sido superior en los néctares. El incremento de los costes ha producido que las diferencias de precio entre los zumos procedentes de concentrado y no procedentes de concentrado se estrechen. Así los zumos refrigerados han ganado terreno frente a los conservados a temperatura ambiente (AIJN, 2012).

El buen comportamiento de estas categorías está determinando que sean los zumos frescos o refrigerados (con una fecha de caducidad menor) los que presentan mejores perspectivas de demanda en el futuro (ICEX, 2012).

En relación al sabor, como puede verse en el gráfico 9.2, en Europa la naranja sigue siendo el sabor más consumido, combinando zumos y néctares seguidos por los sabores mixtos. La innovación en los mixtos se ha incrementado ya que los productores buscan administrar los costes de producción y satisfacer al consumidor en sus preferencias sobre los beneficios funcionales de las combinaciones de frutas (AIJN, 2012).

En España las ventas por sabores están distribuidas de la siguiente manera, las naranja sigue siendo el sabor más consumido, seguido en ventas por la piña y el melocotón y en cuarto lugar los sabores mixtos, que entre los años 2010 y 2012 han subido del último lugar al cuarto en ventas (AIJN, 2010; AIJN, 2012).

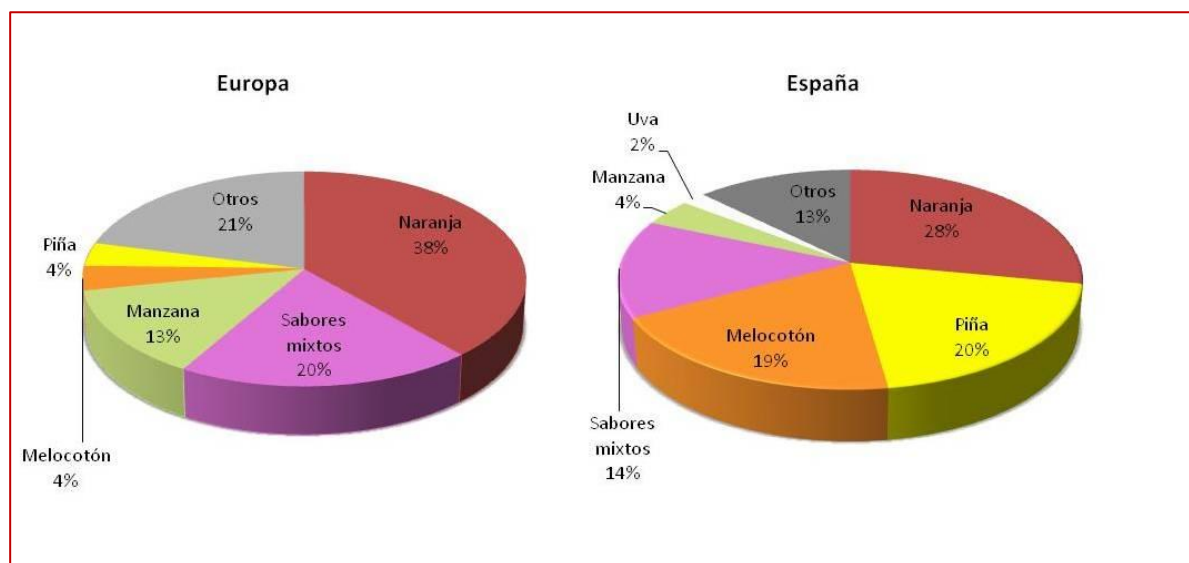


Gráfico 9.2: Distribución de consumo de zumos y néctares por sabores en Europa y en España. Elaboración propia con datos AIJN (2012)

Si se analiza la composición del mercado por tipos de productos (zumos directos, zumos a partir de concentrado y néctares), se comprueba que los zumos representan el 65 % del total, siendo éstos, en un 90 %, zumos elaborados a partir de concentrado, y el 35 % restante corresponde a los néctares. En España, el consumo de productos refrigerados todavía supone una pequeña parte del mercado, representando solo un 6,7 %, mientras que en el modelo europeo alcanza un 18 % de las ventas (Fernández-Ruiz et al. 2011).

Los consumidores siguen siendo sensibles al precio, pero también exigen calidad. Las grandes cadenas de distribución han introducido marcas propias, también conocidas como marca de distribuidor de clase superior con zumo directo. Estos productos han arrebatado cuota de mercado a los zumos elaborados a partir de concentrado. En 2010, las marcas de distribución de zumo elaborado a partir de concentrado se mostraron incapaces de incrementar el volumen de su categoría, ya que los consumidores no percibían que esos productos les brindaran el valor añadido que ofrecen las marcas líderes (Fernández-Ruiz et al. 2011).

Estudio de mercado

Este estudio se consideró de interés por la gran cantidad de variedades de sabores de bebidas de frutas que se han introducido en España en la última década.

El estudio de mercado se realizó revisando en los diferentes supermercados e hipermercados distintas variedades de bebidas a base de fruta que se comercializaron en la Comunidad de Madrid de noviembre de 2010 a junio de 2012 registrando:

- Definición y clasificación de la bebida.
- Método de conservación.
- Procedencia de los ingredientes.
- Composición.

En estos últimos años también en la industria de bebidas, gracias al desarrollo de nuevas técnicas de conservación, se han introducido cambios en los procesos de elaboración de los zumos. Así han proliferado en el mercado español, al igual que a escala mundial, los zumos exprimidos o directos que no proceden de concentrado.

Para poder acotar el estudio se centró la atención en:

- Los sabores de las bebidas a base de frutas que son de consumo no tradicional en España, como los zumos de bayas, frutas tropicales, o mezclas de las mismas.
- La primera clasificación se realizó en función del tipo de bebida de fruta: zumos, néctares y bebidas a base de frutas. Dentro de cada categoría se realizaron las siguientes clasificaciones posteriores:
 - Distinción entre marca privada o marca del distribuidor
 - Se realiza una clasificación de las muestras en función del tipo de conservación que exija el etiquetado.
 - Otro importante criterio, en la actualidad, es si el zumo empleado en la elaboración del producto final es procedente de concentrado o no (directo).

Del estudio realizado en diez supermercados de la Comunidad de Madrid durante los 20 meses anteriormente mencionados, se encontraron 53 productos distintos que respondían a los criterios marcados, los cuales se distribuían según la tabla 9.3:

Tabla 9.3: Resultados del estudio de mercado en relación a la variedad de productos

Producto		Marca privada	Marca del distribuidor
Zumo	23	9	14
Ambiente	7	3	4
Procedente de concentrado	4	3	1
Directo	3		3
Refrigerado	16	6	10
Directo			
Néctar	19	14	5
Ambiente			
Procedente de concentrado	19	14	5
Bebida	11	10	1
Ambiente			
Procedente de concentrado	11	10	1
Total general	53	33	20

En el estudio de mercado se registraron 23 zumos, 19 néctares y 11 bebidas refrescantes a base de fruta. La gran variedad de productos encontrados se debió mayoritariamente a las marcas del distribuidor, que constituyeron el 38 % de los productos registrados.

En relación a la conservación, todos los productos refrigerados recogidos fueron zumos, de hecho el 69,5 % de los zumos fueron refrigerados.

Los zumos directos representan el 82 % del total de los zumos registrados son directos, conservados tanto refrigerados como en ambiente, mientras que tanto los néctares como las bebidas se siguen produciendo en su mayoría a partir de concentrado.

En relación al número de ingredientes que contienen cada uno de los productos bajo estudio se encuentran detallados en la tabla 9.4:

Tabla 9.4: Número de ingredientes de los productos estudiados

Numero de ingredientes	Zumo	Néctar	Bebida
1	5	3	1
2	3	2	2
$3 \leq n \leq 6$	8	9	8
$7 \leq n \leq 9$	1	3	
>9	6	2	

La mayoría de los productos encontrados presentan entre 3 y 6 ingredientes en su composición. A excepción de un zumo de mezcla de frutos rojos, los productos con más de 9 ingredientes en el etiquetado en su mayoría eran productos denominados como "tropicales" que generalmente presentan en su composición, naranja, manzana y plátano, además de frutas tropicales como mango, maracuyá o guayaba.

El estudio proporcionó información sobre la gran variedad de bebidas a base de fruta que hay en la actualidad, y esta variedad se debe a la gran oferta presentada por las marcas del distribuidor y también han contribuido a ella la proliferación de los sabores mixtos.

Las marcas del distribuidor ocupan el 38 % del estudio si se tiene en cuenta las bebidas refrescantes a base de fruta, los néctares y los zumos, pero teniendo en cuenta sólo esta última categoría constituyen el 63 % del total de zumos registrados. En cambio, si se consideran las bebidas refrescantes a base de fruta y los néctares más del 75 % de los productos registrados son de marca privada.

Teniendo en cuenta los criterios iniciales establecidos para el estudio de mercado, es decir que los sabores de los productos no fueran de consumo tradicional en España, el 93 % del total de productos registrados fueron mixtos, atendiendo sólo a la categoría de zumos el 78 % de los mismos fueron de sabores mixtos.

9.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los zumos de fruta son un producto de consumo habitual. Los cambios del mercado de bebidas hacia un estilo de vida más saludable, han producido una gran variedad de productos que alegan propiedades saludables o nutricionales en su etiquetado. Es importante caracterizar estos productos, determinar sus compuestos bioactivos y los efectos que éstos puedan producir. Se han planteado los siguientes objetivos:

- Caracterización de las muestras mediante parámetros fisicoquímicos y la determinación de su contenido en ácidos orgánicos.
- Determinación de compuestos antioxidantes, vitamina C por HPLC, polifenoles totales, mediante el empleo de una nueva metodología denominada Fast Blue BB.
- La evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de distintas bebidas, en las cuales su ingrediente principal es fruta, presentes en los mercados españoles.
- La evaluación del etiquetado tanto de aquellas muestras que alegan declaraciones nutricionales o de propiedades saludables y de los productos que no presentan declaraciones.

9.2. MUESTREO

Para cumplir estos objetivos, una vez realizado el estudio de mercado de las bebidas a base de fruta que se comercializaban en los lineales de zumos de distintos supermercados e hipermercados de la Comunidad de Madrid, se seleccionaron aquellos que presentaban alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en el etiquetado, y otros productos similares a los anteriores pero que no presentaban ningún tipo de declaración en su etiquetado, con el objetivo principal de compararlos. También se tuvieron en cuenta las nuevas categorías comerciales en las que destacan los zumos refrigerados, y si los productos procedían de zumo concentrado o no. Con estos criterios iniciales se seleccionaron los siguientes productos:

Tabla 9.5: Distribución del tipo de producto del muestreo original

		Primera selección	
Productos		Marca del distribuidor	Marca privada
Zumo	10	8	2
Ambiente	2	2	
Refrigerado	8	6	2
Néctar	6	3	3
Ambiente	6	3	3
Bebida	4	1	3
Ambiente	4	1	3
Total	20	12	8

La selección está compuesta principalmente por zumos, néctares y bebidas de frutas mixtas. Según la normativa del Codex Alimentarius, CODEX STAN 247-2005, un zumo mixto es el que se obtiene mezclando dos o más zumos, o zumos y purés de diferentes tipos de frutas.

Según el Real Decreto 781/2013, en el etiquetado de zumos o néctares con dos o más zumos de fruta su lista de ingredientes debe estar escrita en orden decreciente según el volumen de los zumos o purés de frutas incluidos.

Teniendo en cuenta la cuota de mercado alcanzada por las marcas del distribuidor en el sector de este tipo de bebidas, éstas constituyen el 60% del muestreo original mientras que las marcas privadas son el 40 %.

Para la identificación (ID) de las muestras se utilizó un código de al menos dos o tres caracteres alfanuméricos, la letra indica el tipo de bebida a base de fruta Z (zumo), N (néctar), B (bebida) y el número asignado a cada muestra estuvo en función, del contenido en zumo dentro de cada categoría. Todos los productos están recogidos en las tablas 9.6 y 9.7.

Tabla 9.6: Composición de las muestras de zumos analizadas según el etiquetado de los productos

Producto	ID	Composición
Zumo	Z1	Zumo de granada (70 %) y zumo de uva roja (30 %).
Zumo	Z2	Zumo de naranja, puré de plátano, puré de guayaba (13 %), puré de mango (7 %) y zumo de goji (3 %).
Zumo	Z3	Zumo de naranja, variedades Salustiana y Valencia, (80 %) y zumo natural de mango (20 %).
Zumo	Z4	Zumo de piña (26 %), zumo de naranja (24 %), zumo de manzana (22 %), puré de mango (7 %), puré de maracuyá (6 %), puré de albaricoque (6 %), zumo de uva (5 %), puré de plátano (2 %), puré de melocotón (1 %) y puré de pera (1 %).
Zumo	Z5	Zumo de uva roja (48 %), zumo de manzana (16 %), puré de fresa (18 %) y puré de frambuesa (18 %).
Zumo	Z6	Zumo de uva roja (65 %), zumo de granada (25 %) y zumo de grosella roja (10 %).
Zumo	Z7	Zumo de uva roja (65 %), zumo de granada (25 %) y zumo de grosella negra (10 %).
Zumo	Z8	Zumo de uva roja, cereza, grosella (83 %), puré de frambuesa, fresa y mora (10 %), puré de acerola (7 %).
Zumo	Z9	Zumos de naranja, manzana, uva, piña, fruta de la pasión, albaricoque, plátano, mango, melocotón, guayaba, pera, limón.
Zumo	Z10	Zumo de uva roja (99,9 %) y extracto de canela (0,1 %)

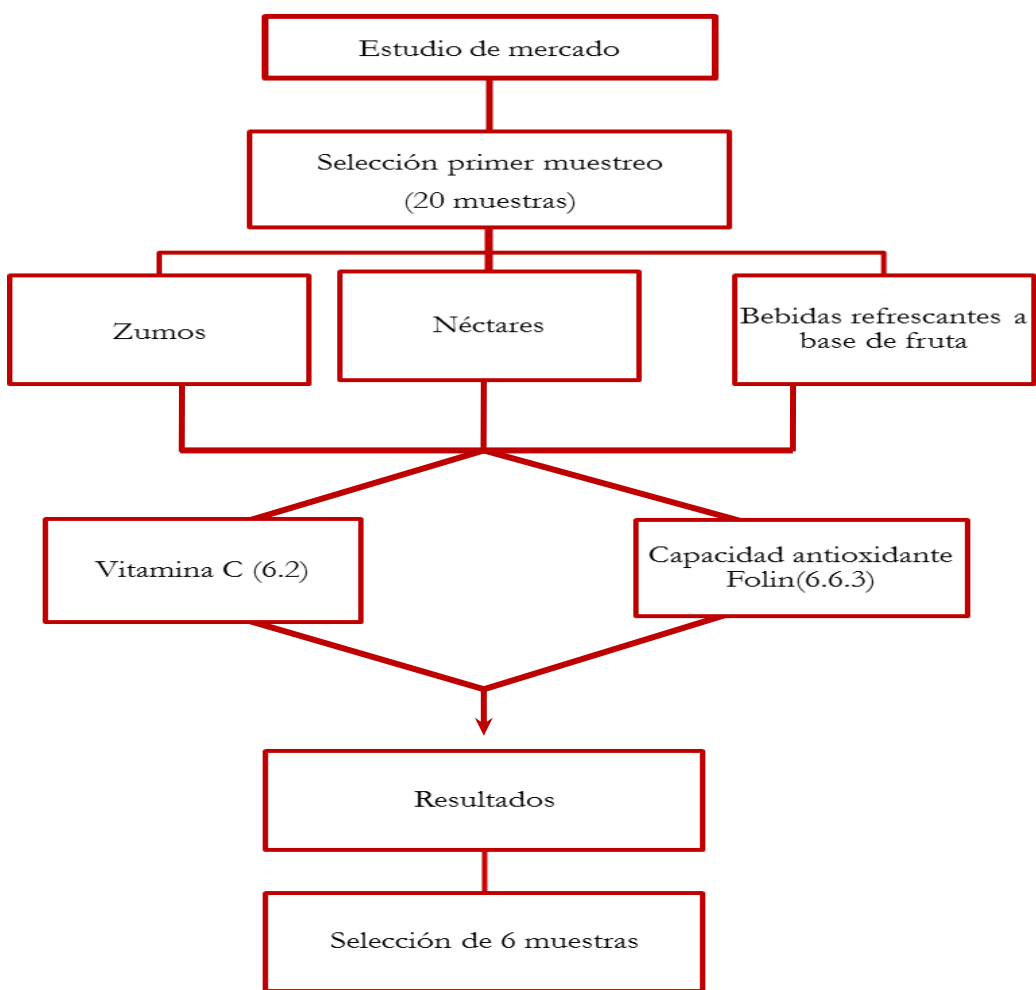
Tabla 9.7: Composición de néctares y bebidas de fruta analizados según el etiquetado de los productos

Producto	ID	% de zumo	Ingredientes
Néctar	N11	66 % de zumo de frutas y zanahoria a base de concentrado (36 % naranja, 15 % frambuesa, 8 % zanahoria, 5 % acerola y 2 % grosella negra).	Azúcar
Néctar	N12	63 % de zumo de frutas a base de concentrado (40 % piña, 18 % grosella negra y 5 % ciruela).	Agua, azúcar y estabilizador de pectina
Néctar	N13	55 % de zumos y purés elaborados a partir de concentrado de frambuesa, cereza, granada, mora, grosella, manzana y uva tinta, en proporciones variables.	Sucralosa y acesulfamo potásico.
Néctar	N14	50 % de zumos concentrados de naranja, limón zanahoria a partir de concentrado	
Néctar	N15	50 % de zumos concentrados y purés manzana, naranja y maracuyá a partir de concentrado, puré de plátano y mango	
Cóctel	N16	50 %, de zumos concentrados de manzana, pera, naranja, maracuyá, limón y piña, purés de plátano, melocotón, ciruela amarilla, pera y mango.	
Bebida	B17	65 % de zumos a base de concentrado, piña, manzana y arándanos.	Extracto de zanahoria y extracto de frutas rojas.
Bebida	B18	60 % de zumos a base de concentrado de naranja, mora, uva y frambuesa.	Extracto de zanahoria y extracto de frutas rojas.
Bebida	B19	50 % de zumos de frutas a base de concentrado; 30 % manzana, 18 % uva y 2 % kiwi.	Extracto de uva y té verde.
Bebida	B20	30 % de zumos concentrados; 11 % de zumo de arándanos, 7 %, de zumo de grosella, 2 % zumo de sauco, zumos de uva y manzana (cantidad de ambos no especificada en el etiquetado).	Fibra, ácido cítrico, sucralosa y acesulfamo potásico.

9.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Como se recoge en el esquema 9.1 del plan de trabajo en la primera selección de muestras se evaluó su contenido en vitamina C y su capacidad antioxidante por el método de sustancias reductoras totales (Folin).

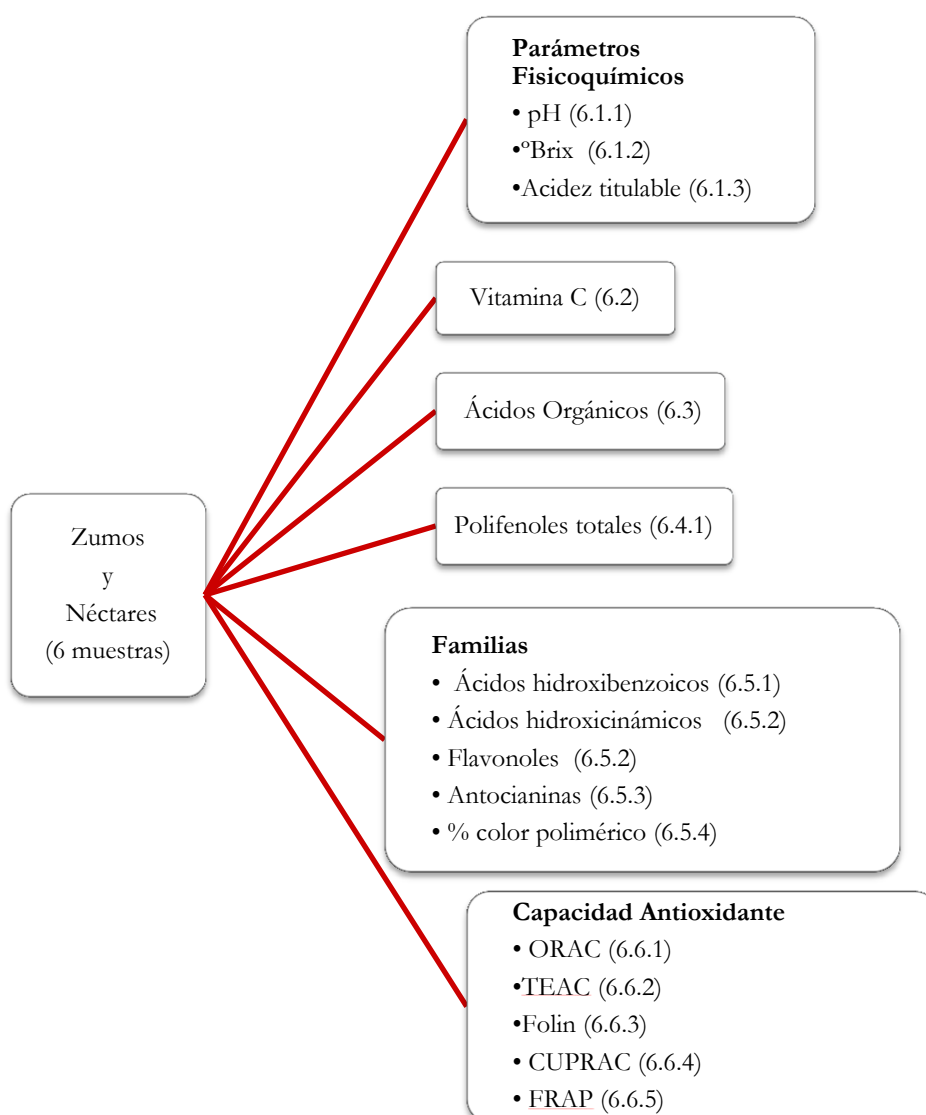
Esquema 9.1: Plan de trabajo en el primer muestreo



Además se realizó la revisión del etiquetado de las 20 muestras. Para ello se agruparon en tres grupos distintos, según el tipo de declaración, y una vez estudiada el etiquetado cada uno de los productos se comparó con la legislación vigente en el momento de adquisición de las muestras.

Para un análisis más exhaustivo de los compuestos bioactivos y de la capacidad antioxidante, se seleccionaron seis muestras (muestreo definitivo), 3 zumos y 3 néctares de las cuales se analizaron tres lotes distintos de cada muestra. Se les caracterizó mediante parámetros fisicoquímicos, se evaluó su contenido en compuestos bioactivos y su capacidad antioxidante. Todas las determinaciones realizadas a este muestreo se encuentran reflejadas en el esquema 9.2.

Esquema 9.2: Plan de trabajo de la selección final de muestras



9.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.4.1. Selección de las muestras

Para llegar a la selección final de 3 zumos y 3 néctares se determinó previamente el contenido en vitamina C y la capacidad antioxidante de las 20 muestras preseleccionadas tras el estudio de mercado.

El contenido en vitamina C se determinó por el método analítico 6.2; para ello se tomaron 2 ml de cada muestra y se diluyeron en un matraz de 25 ml con HPO_3 al 4,5 %, se mezcló durante 15 minutos en oscuridad, se filtró por papel y a continuación se filtró por un microfiltro de 0,45 μm de tamaño de poro, y se cuantificó por HPLC-UV a una longitud de onda de 245 nm. Los resultados se expresaron en mg ácido ascórbico/100 ml de muestra.

La capacidad antioxidante se evaluó por el ensayo de sustancias reductoras totales Folin-Ciocalteu (6.6.3), que se realizó tal y como se describió anteriormente en la metodología analítica. En la tabla 9.8 se muestra su contenido en vitamina C y la capacidad antioxidante.

El contenido en ácido ascórbico se encuentra entre 0,71 y 111,96 mg ácido ascórbico/100 ml de muestra. De estos resultados, a excepción del zumo Z8 y la bebida B19, todos los productos en los que se determinó ácido ascórbico poseían en su composición zumo de naranja o de piña.

Los valores mayores fueron determinados en dos néctares N15 y N16, con 80,87 y 111,96 mg ácido ascórbico/100 ml de néctar respectivamente. Ambos presentan en su composición un 50 % en zumos de fruta y además presentan adición de vitaminas en su etiquetado, lo que contribuye a unos valores tan elevados con respecto a los demás productos analizados.

En cambio, hay cinco zumos, un néctar y una bebida, donde no se pudo determinar valor de contenido en vitamina C, la mayoría de ellos compuestos por zumos de fruta como uva, dónde no se han encontrado cantidades significativas de ácido ascórbico, entre 0,8 y 2,9 mg ácido ascórbico/100 ml (Souci et al. 2008). Además hay que tener en cuenta que estos productos han sido sometidos a procesos de conservación, posiblemente térmicos, con lo que implicaría la destrucción de la vitamina C (Cámara et al. 1995).

Tabla 9.8: Contenido en vitamina C y capacidad antioxidante del primer muestreo

Muestra	Vitamina C mg ácido ascórbico/100 ml	Folin-Ciocalteu mg ácido gálico/l
Zumos		
Z1	n.d	815,50 ± 12,74 ^{bc}
Z2	28,77 ± 1,53 ^b	779,50 ± 25,95 ^b
Z3	52,69 ± 1,81 ^d	1181,69 ± 24,33 ^c
Z4	20,07 ± 0,43 ^a	669,66 ± 10,71 ^a
Z5	n.d	802,96 ± 12,19 ^b
Z6	n.d	864,68 ± 18,73 ^c
Z7	n.d	1338,44 ± 18,73^f
Z8	74,08 ± 0,68^e	1054,43 ± 43,46 ^d
Z9	34,70 ± 0,79 ^c	652,00 ± 33,72 ^a
Z10	n.d	774,21 ± 44,95 ^b
Néctares		
N11	52,63 ± 1,14 ^c	624,10 ± 12,24 ^d
N12	8,20 ± 0,38 ^b	824,54 ± 33,72^e
N13	n.d	569,35 ± 18,61 ^c
N14	37,75 ± 1,63 ^b	498,15 ± 3,00 ^b
N15	80,87 ± 1,21 ^d	484,73 ± 13,79 ^b
N16	111,96 ± 3,97^e	345,53 ± 8,75 ^a
Bebidas		
B17	1,28 ± 0,00 ^b	390,10 ± 3,75 ^a
B18	0,71 ± 0,02 ^a	461,63 ± 14,98 ^c
B19	2,79 ± 0,13^c	660,30 ± 3,75^d
B20	n.d	427,19 ± 3,75 ^b

Letras distintas en cada columna en cada uno de los productos evaluados (zumos, néctares o bebidas) indican diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados obtenidos, muestran en algunos casos cantidades muy elevadas, próximas o incluso superando cantidad diaria recomendada (CDR) para la población española de vitamina C que se sitúa en 80 mg ácido ascórbico/día (Directiva 2008/100/CE).

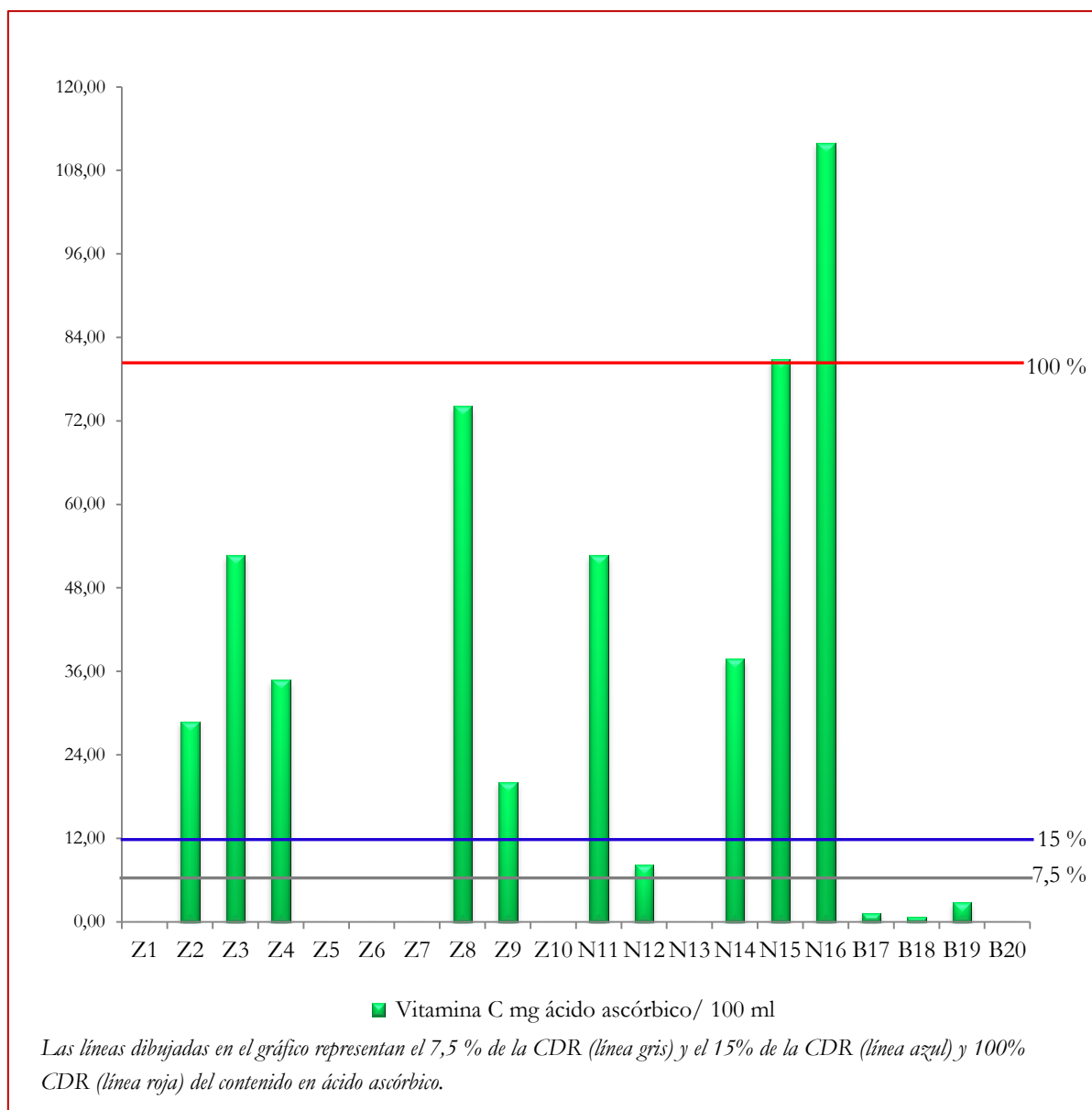


Gráfico 9.3: Contenido en vitamina C

Al observar el gráfico 9.3, se ve claramente cómo, con excepción de las bebidas, y el néctar N12, todos los zumos y néctares con ácido ascórbico en su composición superan el 15 % de la CDR para la vitamina C, de hecho los néctares N15 y N16 superan el 100 % de la CDR.

Según la legislación actual (Reglamento 1169/2011) para poder efectuar una declaración nutricional indicando que un alimento es "Fuente de" un nutriente determinado, el producto en cuestión debe poseer una cantidad significativa del mismo en 100 g de producto, mientras que podrá indicarse que el producto posee un "Alto contenido" del mismo si contiene al menos el doble de dicha cantidad significativa.

Lo que se entiende por cantidad significativa se define en el Reglamento 1169/2011: un 7,5 % del Valor de Referencia de Nutrientes (VRN) establecido en el mismo Reglamento, para el caso de las bebidas, y contenido en cada 100 ml de la misma. El VRN en el caso de la vitamina C es de 80 mg.

Debido a que esta legislación se aprobó en octubre del 2011, y su cumplimiento no ha sido obligatorio hasta el 13 de diciembre de 2014, hasta ese momento, el etiquetado de las muestras objeto de este estudio, en relación a lo que se entiende por "cantidad significativa", está regulado por el Reglamento 1925/2006, el cual remite a la Directiva 90/496, transpuesta al ordenamiento jurídico español por el Real Decreto 930/1992, sobre etiquetado de propiedades nutritivas de los alimentos, que establece dicha cantidad significativa en un 15 % de la Cantidad Diaria Recomendada (CDR), fijada para la vitamina C en 60 mg/día esta cantidad fue modificada posteriormente en la Directiva 2008/100/CEE a 80 mg/día . Como se verá a continuación la mayoría de estos productos contienen declaraciones nutricionales en relación con su contenido en vitamina C, ya sea como fuente o como alto contenido.

En la tabla 9.8 se recogen también los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad antioxidante, que variaron entre 345,53 mg ácido gálico/l (N16) y 1338,44 mg gálico/l (Z7).

Dentro de estos valores analizados un hecho que destacó fue que entre la muestra Z6 (864,68 mg ácido gálico/l) y Z7 (1338,44 mg ácido gálico/l), que sólo se diferencian en la variedad de zumo de grosella que contienen, roja y negra respectivamente, presentaron valores muy diferentes. Este hecho podría explicarse por la gran diferencia de valores determinados en las frutas por Jakobek et al. (2007), empleando el reactivo Folin-Ciocalteu, para grosellas rojas en 1947,94 mg ácido gálico/Kg y en grosellas negras de 5435,06 mg ácido gálico/Kg.

En la evaluación de la capacidad antioxidante tanto los zumos como los néctares presentaron menores diferencias estadísticamente significativas que las bebidas a base de fruta.

Los zumos Z4 y Z9 no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos, ambos se definen en el etiquetado como "tropicales", de la misma manera los néctares N14 y N15 cuyo ingrediente mayoritario en ambos casos es la naranja tampoco las presentan, mientras que las bebidas refrescantes a base de fruta presentaron diferencias estadísticamente significativas entre todas sus muestras, en ambos ensayos.

En el gráfico 9.4, se observa claramente cómo la capacidad antioxidante disminuye según lo hace el contenido en zumo de fruta, del 100 % contenido en los zumos al 30 % que contiene la última bebida (B20).

Atendiendo a su clasificación según el etiquetado, salvo por el néctar N12 y la bebida B19, se podría establecer un ranking inicial entre las muestras de tal forma que los zumos presentan mayor capacidad que los néctares y éstos a su vez mayor que las bebidas a base de frutas.

Gráficamente (gráfico 9.4) se observa claramente cómo el néctar N12 presentó mayor capacidad antioxidante que los zumos Z9 y Z10 y la capacidad antioxidante que se obtuvo en B19 fue mayor que las obtenidas para los néctares N13, N14, N15 y N16.

En el caso del néctar N12 la presencia de zumos de frutas rojas, comparado con el zumo Z9, puede contribuir a su valor más elevado, y al compararlo con el Z10 (zumo de uva roja), la presencia de ácido ascórbico en N12 incrementa el valor de su capacidad antioxidante con respecto a un zumo que no lo contiene.

La excepción de la bebida B19, puede ser debida a que además de la presencia de zumos de fruta a base de concentrado, contiene como ingredientes dos extractos uno de uva y otro de té verde, que podrían contribuir al valor del Folin obtenido. De hecho en comparaciones de capacidad antioxidante de bebidas refrescantes que poseen extractos de té, se han obtenido valores de polifenoles por el método Folin-Ciocalteu entre 73,5 y 75 mg ácido gálico/l (de Quirós et al. 2009).

La mayor capacidad antioxidante evaluada por el método Folin-Ciocalteu correspondió al zumo Z7. Dentro de los néctares ésta correspondió al N12 y como se ha mencionado anteriormente en las bebidas refrescantes a base de fruta fue la B19.

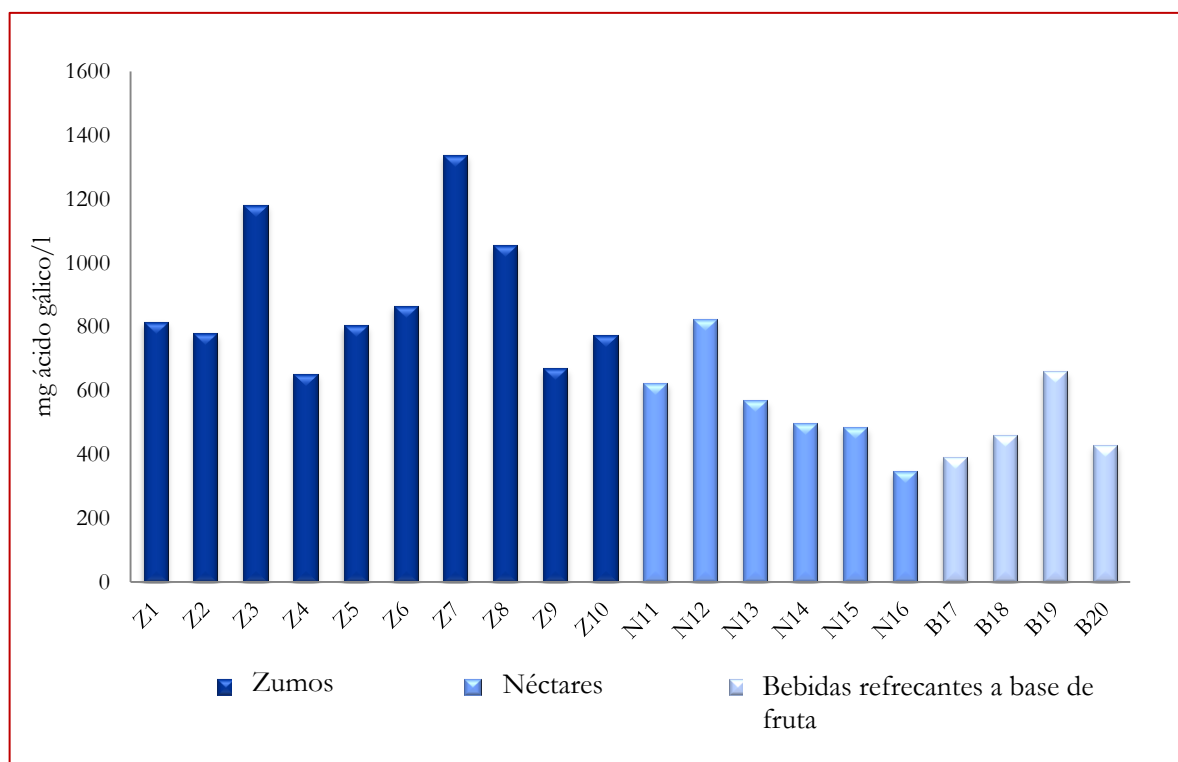


Gráfico 9.4: Capacidad antioxidante de la primera selección evaluada por el método Folin

A diferencia de lo observado para el contenido en vitamina C, los resultados en los zumos, con excepción del zumo Z3 que presentó un valor elevado (1181,69 mg ácido gálico/l) y Z9 (774,21 mg ácido gálico/l) que presentó un valor relativamente bajo, fueron mayores según lo era el contenido en frutos rojos de los productos. Si se observa más detenidamente la tabla 9.8 los productos con los valores por encima de 800 mg ácido gálico/l tenían frutas rojas en su composición. En los néctares y bebidas este hecho no es tan evidente debido a la diferencia en porcentaje de zumo que presentan los productos.

Las bebidas refrescantes a base de zumo de fruta analizadas en esta primera selección están reguladas por el Real Decreto 650/2011 que establece la reglamentación técnico-sanitaria en materia de bebidas refrescantes y también por el Reglamento 1333/2008 sobre aditivos alimentarios y por el Reglamento 1334/2008 sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos.

Para realizar el estudio más exhaustivo se seleccionaron 3 zumos y 3 néctares atendiendo al valor obtenido en el método Folin y las consideraciones siguientes:

- El criterio para seleccionar los zumos se basó en las categorías comerciales que más han incrementado sus ventas en los últimos años, por ello se eligió un zumo directo a temperatura ambiente, un zumo refrigerado y un zumo exprimido, escogiendo a su vez dos zumos de marca del distribuidor y otro de marca privada.
- Se escogió un néctar de marca del distribuidor que a su vez contenía más de cuatro frutas en sus ingredientes. Otro de los néctares se seleccionó por su alto contenido en vitamina C 50 mg/100 ml y a pesar de no indicar la adición de esta vitamina como ingrediente.
- El último néctar se escogió porque contiene como ingrediente mayoritario la piña, en lugar de la uva o naranja como el resto de los productos escogidos.
- Las bebidas son descartadas ya que la mayoría de ellas presentan una gran variabilidad en su composición.

Con los resultados obtenidos en el primer muestreo se seleccionaron las siguientes muestras, los criterios para esta elección se exponen a continuación en la tabla 9.9:

Tabla 9.9: Composición del muestreo definitivo

ID	Composición	Ingredientes
Z3	Zumo de naranja, variedades Salustiana y Valencia, (80 %) y zumo natural de mango (20 %).	
Z7	Zumo de uva roja (65 %), zumo de granada (25 %), zumo de grosella negra (10 %).	
Z8	Zumo de uva roja, cereza, grosella (83 %), puré de frambuesa, fresa y mora (10 %), puré de acerola (7 %).	
N11	66 % zumo de frutas base de concentrado (36 % naranja, 15 % frambuesa, 8 % zanahoria, 5 % acerola, 2 % grosella negra).	Agua y azúcar
N12	63 % zumo de frutas a base de concentrado (40 % piña, 18 % grosella negra y 5 % ciruela)	Agua, azúcar y estabilizador de pectina
N13	55 % de zumos y purés elaborados a partir de concentrado de frambuesa, cereza, granada, mora, grosella, manzana y uva tinta, en proporciones variables	Sucralosa y acesulfamo potásico.

Las muestras escogidas son 3 néctares y 3 zumos, todos ellos clasificados como mixtos ya que presentan más de una fruta en su composición.

Dos de los tres néctares escogidos contienen azúcar añadido mientras que en el otro se ha sustituido por edulcorantes; todos ellos además están compuestos por agua, y zumo procedente de concentrado.

En el etiquetado de los zumos escogidos destacan que son de zumo directo o exprimido, pudiéndose distinguir, a su vez, por su método de conservación, uno en ambiente y los otros dos refrigerados, de ellos dos, uno presenta una fecha de caducidad inferior a una semana desde su fecha de elaboración, lo que en la etiqueta se declara como zumo exprimido.

9.4.2. Parámetros fisicoquímicos

En el esquema 9.2 se ha reflejado el método empleado para determinar cada uno de los parámetros analizados.

Las muestras analizadas en este estudio contienen más de un zumo o puré de fruta en su composición por lo que el resultado de la acidez titulable se expresó en g ácido cítrico/l. Además según los datos recogidos en la legislación, Real Decreto 1044/1987 y Real Decreto 1518/2007, la expresión del resultado en función del ácido cítrico es la que más se aplica en una mayor variedad de frutas, exceptuando al zumo de uva que se expresa en g ácido tartárico/l (Real Decreto 1044/1987) y al de la manzana en g ácido málico/l (Real Decreto 1518/2007).

Los resultados obtenidos de los métodos de determinación de pH, °Brix, y acidez titulable en cada lote se muestran a continuación, en las tablas 9.10 para zumos y en la tabla 9.11 para los néctares.

En la tabla 9.10 se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas entre los tres lotes del zumo Z8 para los tres parámetros analizados. Esta heterogeneidad interlote se observa también, aunque en menor medida, en el zumo Z3, con diferencias estadísticamente significativas para los valores de °Brix obtenidos en los tres lotes, para la acidez titulable sólo en dos de ellos y sin estas diferencias para los resultados de pH.

Tabla 9.10: Parámetros analizados en zumos

Muestra	Lote	pH	°Brix	Acidez titulable
Z3	1	$3,60 \pm 0,04^a$	$14,16 \pm 0,28^c$	$8,79 \pm 0,59^{ab}$
	2	$3,61 \pm 0,02^a$	$13,56 \pm 0,11^b$	$8,33 \pm 0,11^a$
	3	$3,61 \pm 0,01^a$	$13,20 \pm 0,07^a$	$9,10 \pm 0,07^b$
Z7	1	$3,22 \pm 0,02^b$	$17,10 \pm 0,07^b$	$6,32 \pm 0,07^b$
	2	$3,09 \pm 0,01^a$	$17,04 \pm 0,11^b$	$6,51 \pm 0,04^b$
	3	$3,10 \pm 0,01^a$	$15,40 \pm 0,10^a$	$5,69 \pm 0,09^a$
Z8	1	$3,30 \pm 0,00^a$	$14,38 \pm 0,08^a$	$4,38 \pm 0,04^a$
	2	$3,44 \pm 0,02^b$	$15,38 \pm 0,08^c$	$4,85 \pm 0,11^b$
	3	$3,40 \pm 0,01^c$	$14,92 \pm 0,13^b$	$5,20 \pm 0,10^c$

Letras distintas en cada columna en cada uno de los zumos evaluados (Z3, Z7 y Z8) indican diferencias estadísticamente significativas entre sus lotes.

En el zumo Z7 sólo se aprecian diferencias entre un lote y los otros dos en todos los ensayos. Aunque también especifica que es un zumo directo, constituido por 65 % zumo de uva, 25 % de zumo de granada y 10 % de zumo de grosella negra, la variación observada en el °Brix en el lote 3 puede ser explicada por la variabilidad natural en la composición de alguno de los zumos de fruta que lo constituyen.

Las variaciones observadas pueden ser debidas en el zumo Z8 a las diferencias de composición de un lote a otro, ya que según su etiquetado su composición entre ciertos zumos o purés de frutas puede ser variable (tabla 9.9).

El zumo Z3 es un "zumo exprimido" según su etiquetado, y su variabilidad podría ser debida al contenido de azúcares solubles de la variedad de fruta empleada.

Tabla 9.11: Parámetros analizados en néctares

Muestra	Lote	pH	°Brix	Acidez titulable
N11	1	$3,61 \pm 0,01^b$	$11,44 \pm 0,05^a$	$4,81 \pm 0,04^b$
	2	$3,51 \pm 0,02^a$	$11,58 \pm 0,08^{ab}$	$4,68 \pm 0,07^a$
	3	$3,52 \pm 0,02^a$	$11,62 \pm 0,18^b$	$4,87 \pm 0,04^b$
N12	1	$3,34 \pm 0,03^b$	$12,72 \pm 0,08^b$	$6,29 \pm 0,04^a$
	2	$3,36 \pm 0,02^b$	$12,52 \pm 0,04^a$	$6,70 \pm 0,10^b$
	3	$3,29 \pm 0,01^a$	$12,50 \pm 0,00^a$	$6,38 \pm 0,10^b$
N13	1	$3,34 \pm 0,03^b$	$6,82 \pm 0,08^b$	$4,31 \pm 0,13^b$
	2	$3,19 \pm 0,01^a$	$6,68 \pm 0,11^a$	$3,97 \pm 0,04^a$
	3	$3,18 \pm 0,01^a$	$6,74 \pm 0,05^{ab}$	$4,05 \pm 0,19^a$

Letras distintas en cada columna en cada uno de los néctares evaluados (N11, N12 y N13) indican diferencias estadísticamente significativas entre sus lotes.

En cambio en la tabla 9.11, se puede observar cómo los resultados obtenidos en los néctares son más homogéneos entre sus lotes. Dentro de los resultados obtenidos los °Brix de N11 y N12, prácticamente duplican a N13.

Este hecho es debido a que en este último néctar se ha sustituido el azúcar por edulcorantes, concretamente por sucralosa y acesulfamo potásico, lo que implica que al reconstituirlo no lleva azúcar añadido, con lo que su °Brix corresponde a los azúcares que aportan los zumos y purés de frutas concentrados que constituyen el 55 % del producto final.

Los resultados de las muestras se presentan a continuación en el gráfico 9.5, donde se aprecia que para todos los parámetros analizados existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres zumos y entre los tres néctares.

El intervalo de pH de los zumos se encuentra entre 3,14 y 3,61, y en los néctares el intervalo se halló entre 3,23 y 3,54. Tanto para los zumos como para los néctares los valores más bajos (más ácidos) corresponden a los productos que mayores porcentajes de frutas rojas contienen, Z7 y N13, mientras que los valores menos ácidos correspondieron a los productos cuyo componente principal es la naranja, Z3 y N11 respectivamente.

Los componentes mayoritarios en los zumos (tabla 9.9) fueron zumo de naranja en el zumo Z3 y zumo de uva, en los zumos Z7 y Z8. Si comparamos los valores medios obtenidos en el °Brix de cada uno de los zumos, $13,64 \pm 0,44$ °Brix en Z3, $16,51 \pm 0,82$ °Brix en Z7 y $14,89 \pm 0,43$ °Brix en Z8, comparados con los valores mínimos correspondientes a sus ingredientes mayoritarios zumo de naranja 11,2 °Brix y zumo de uva 15,9 °Brix, ambos según la Directiva 2012/112/CE (tabla 9.1), sólo los valores de Z8 quedan ligeramente por debajo del 15,9 °Brix establecido para el zumo de uva.

Los °Brix correspondientes a los néctares son menores que en los zumos, especialmente como se ha mencionado anteriormente N13 con un valor medio obtenido de $6,75 \pm 0,10$ °Brix, mientras que en los otros dos néctares se determinaron valores de $11,5 \pm 0,14$ °Brix para N11 y $12,59 \pm 0,11$ °Brix para N12. De la misma forma que en los zumos si los comparamos con los °Brix correspondientes a sus componentes mayoritarios, 11,2 °Brix para el zumo de naranja (N11), zumo de piña en N12 (12,8 °Brix) y zumo de uva en N13, (15,9 °Brix), el néctar N12, al igual que el zumo Z8, queda ligeramente por debajo.

Los resultados obtenidos en los zumos para la acidez titulable fueron para Z3 $8,88 \pm 0,42$, para Z7 $6,33 \pm 0,33$ y para Z8 $4,82 \pm 0,39$ g ácido cítrico/l, todos ellos se encuentran dentro del intervalo recogido en la legislación. Z3 se encuentra dentro del intervalo establecido en el Real Decreto 1518/2007 para la naranja (5,8 a 15,4 g cítrico/l) y los zumos Z7 y Z8 dentro del rango establecido en el Real Decreto 1044/1987 para el zumo de uva (4,48 a 12,80 expresado en g cítrico/l, 3,5-10 g ácido tartárico/l).

En los néctares, de igual manera que en los zumos, los valores del néctar N11, $4,79 \pm 0,10$ g cítrico/l, se encontraría ligeramente por debajo según la legislación vigente pero hay que tener en cuenta la posible contribución de los demás constituyentes. En el N12 con un valor medio de $6,46 \pm 0,20$ g ácido cítrico/l, cuyo componente principal es el zumo de piña entre 3,2 a 11,5 g cítrico/l (Real Decreto 1518/2007), el valor obtenido estaría dentro de este rango.

El etiquetado del néctar N13 con un valor medio experimental de $4,11 \pm 0,19$ g cítrico/l, no indica su componente mayoritario, pero según análisis posteriores parecen ser el zumo de uva, 4,48 a 12,80 expresado en g cítrico/l, y zumo de manzana, con un intervalo de 3,30 a 11,18 expresado g cítrico/l (2,3-7,8 g ácido málico/l, Real Decreto 1518/2007).

Este valor se sitúa dentro del intervalo establecido en la legislación para la manzana aunque ligeramente por debajo del mínimo establecido en la legislación para la uva, pero además ha de tenerse en cuenta el resto de los componentes de este néctar.

Atendiendo a los ingredientes que componen los zumos y néctares la mayor acidez titulable correspondió al Z3 compuesto en un 80% por zumo de naranja y en los néctares fue el N12 que en un 40 % está compuesto por zumo de piña concentrado.

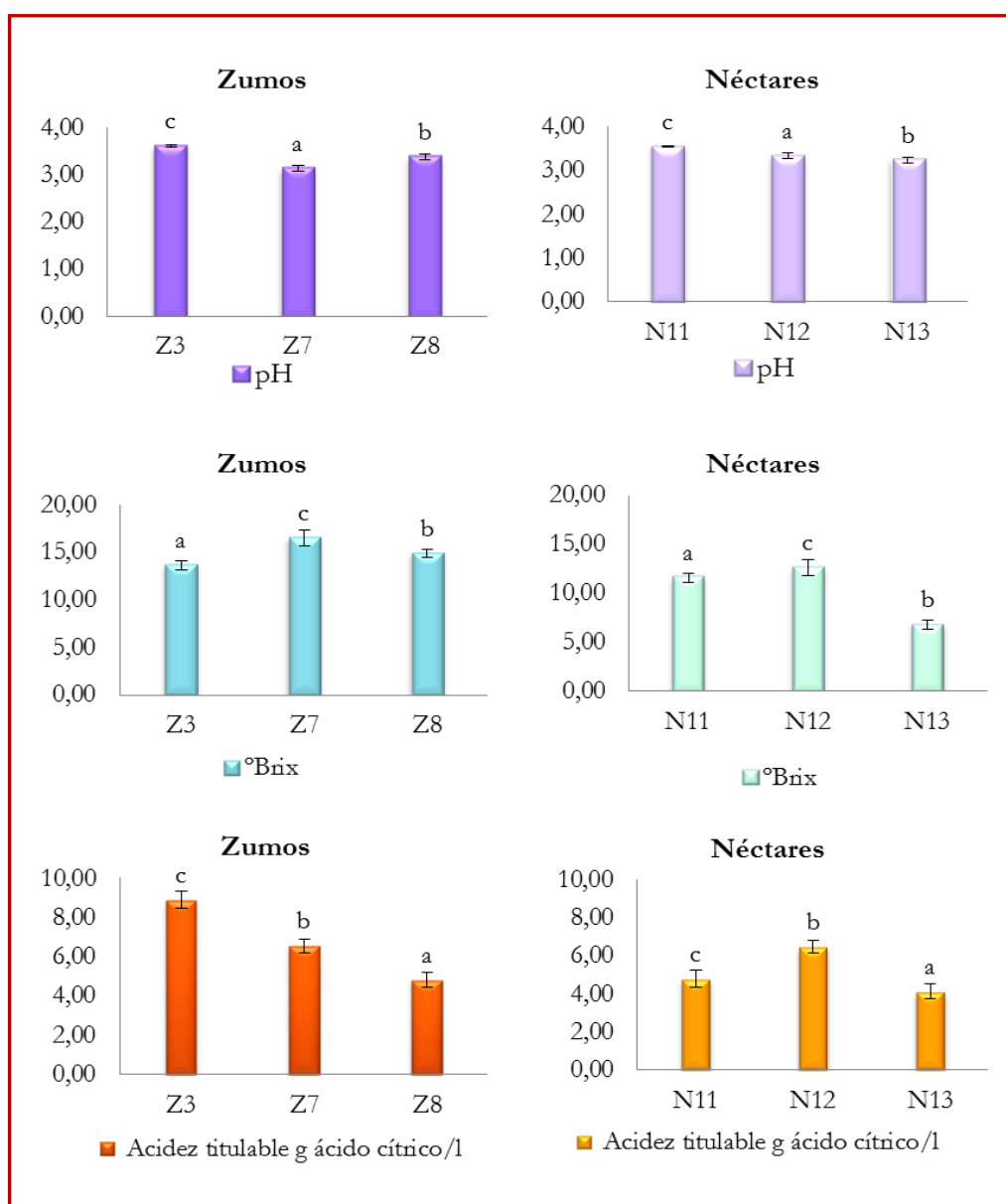


Gráfico 9.5: Parámetros fisicoquímicos por muestra en zumos y néctares

9.4.3. Vitamina C

El procedimiento empleado fue el mismo que se utilizó en la primera selección de muestras, los resultados obtenidos en cada lote de zumos y néctares se recogen en la tabla 9.12, mientras que los valores medios de cada muestra se recogen en la tabla 9.13.

Tabla 9.12: Contenido en ácido ascórbico en zumos y néctares

Zumos	Lote	Vitamina C mg ácido ascórbico/100 ml	Néctares	Lote	Vitamina C mg ácido ascórbico/100 ml
Z3	1	52,69 ± 1,81 ^b	N11	1	69,41 ± 1,37 ^b
	2	45,44 ± 1,09 ^b		2	72,23 ± 0,73 ^c
	3	45,03 ± 1,72 ^a		3	65,66 ± 0,02 ^a
Z7	1	n.d	N12	1	8,77 ± 0,01 ^a
	2	n.d		2	13,73 ± 0,22 ^b
	3	n.d		3	12,80 ± 0,00 ^b
Z8	1	55,16 ± 1,70 ^b	N13	1	n.d
	2	49,48 ± 1,62 ^a		2	n.d
	3	64,81 ± 1,99 ^c		3	n.d

Letras distintas en cada columna en cada uno de los productos evaluados (Z3, Z7 Z8, N11, N12 y N13) indican diferencias estadísticamente significativas entre sus lotes.

En el zumo Z7, como en el néctar N13, no se ha detectado ácido ascórbico en ninguno de sus lotes. Si observamos los datos obtenidos la tabla 9.12, en el zumo Z8 el contenido en ácido ascórbico presentó diferencias estadísticamente significativas entre todos sus lotes, mientras que el Z3 sólo la presentó uno de sus lotes con respecto a los otros dos.

De la misma manera que en los zumos, en los néctares el N11 presentó diferencias entre todos sus lotes mientras que el N12 lo hizo sólo en un lote con respecto a los otros dos. Este hecho puede ser debido a ligeras variaciones en su contenido de zumo o simplemente a diferencias en el procesado o en el almacenamiento de estos productos debido a la termolabilidad de la vitamina C.

Tabla 9.13: Contenido en ácido ascórbico por muestra

Muestra	Vitamina C mg ácido ascórbico/100 ml
Zumos	
Z3	$47,72 \pm 4,04^a$
Z7	n.d
Z8	$56,65 \pm 7,31^b$
Néctares	
N11	$69,10 \pm 2,96^b$
N12	$12,04 \pm 2,28^a$
N13	n.d

Letras distintas en cada columna dentro de cada producto indica diferencias estadísticamente significativas entre los zumos y néctares.

En la tabla 9.13 se puede observar que tanto los zumos como los néctares presentan diferencias estadísticamente significativas en su contenido. El mayor contenido entre las muestras correspondió a N11 con 69,10 mg ácido ascórbico/100 ml.

Martí et al. (2009) recogieron rangos de vitamina C en zumos de naranja comerciales entre 35 y 83 mg ácido ascórbico/100 ml. El contenido tanto del zumo como del néctar (Z3 y N11), que contienen naranja en su composición se encuentran dentro de este rango.

La presencia de un valor relativamente alto de vitamina C en el Z8 (56,65 mg ácido ascórbico/100 ml) lo más probable es que sea debido a su contenido en un 7% de acerola, ya que en este zumo de fruta se han detectado cantidades de 42 mg/100 ml ácido ascórbico (Mezadri et al. 2008).

9.4.4. Ácidos orgánicos

La identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos se realizó mediante el método descrito en el apartado 6.3. Para ello se realizó una dilución del zumo o néctar (2 ml) con fase móvil.

Su determinación en zumos de frutas es importante por su influencia en las propiedades organolépticas, en la estabilidad y control microbiológico de estas bebidas. Su análisis, además, permite comprobar el estado de maduración de la fruta y el control de la evolución de la acidez (Leopold et al. 2006).

En las muestras analizadas se han encontrado diferentes ácidos orgánicos, como corresponde a las diferentes frutas de partida, de nuevo la mayor variabilidad entre los lotes, en cuanto a la composición en ácidos orgánicos, corresponde a los zumos.

Se han podido identificar y cuantificar, siempre y cuando estuvieran presentes, los siguientes ácidos orgánicos: oxálico, quínico, málico y cítrico en todas las muestras, y tartárico, siquímico, fumárico y succínico sólo en alguna de ellas. Al ser productos mixtos, su perfil de ácidos orgánicos será una mezcla entre los distintos perfiles de los ácidos que componen cada producto.

A continuación se muestran los perfiles cromatográficos de cada una de las muestras analizadas, figuras 9.1 y 9.2, y los resultados de los ácidos orgánicos por lote, en las tablas 9.14 para los zumos y 9.15 para los néctares, para las muestras los resultados están recogidos en la tabla 9.16

En la figura 9.1 está representado el perfil de ácidos orgánicos de cada zumo analizado. Como ejemplo se ha puesto el perfil de un lote por zumo analizado, debido a que en los tres lotes de cada uno de los zumos analizados se identificaron y cuantificaron los mismos ácidos orgánicos, aunque presentaron algunas variaciones de concentración (tabla 9.14).

Entre los perfiles de los ácidos orgánicos tanto de los néctares como de los zumos (figuras 9.1 y 9.2), el pico 5 representa al ácido ascórbico. Aunque sea identificable a esta longitud de onda, 215 nm, presenta su máximo de absorbancia a 245 nm y a esa longitud de onda ha sido cuantificado anteriormente.

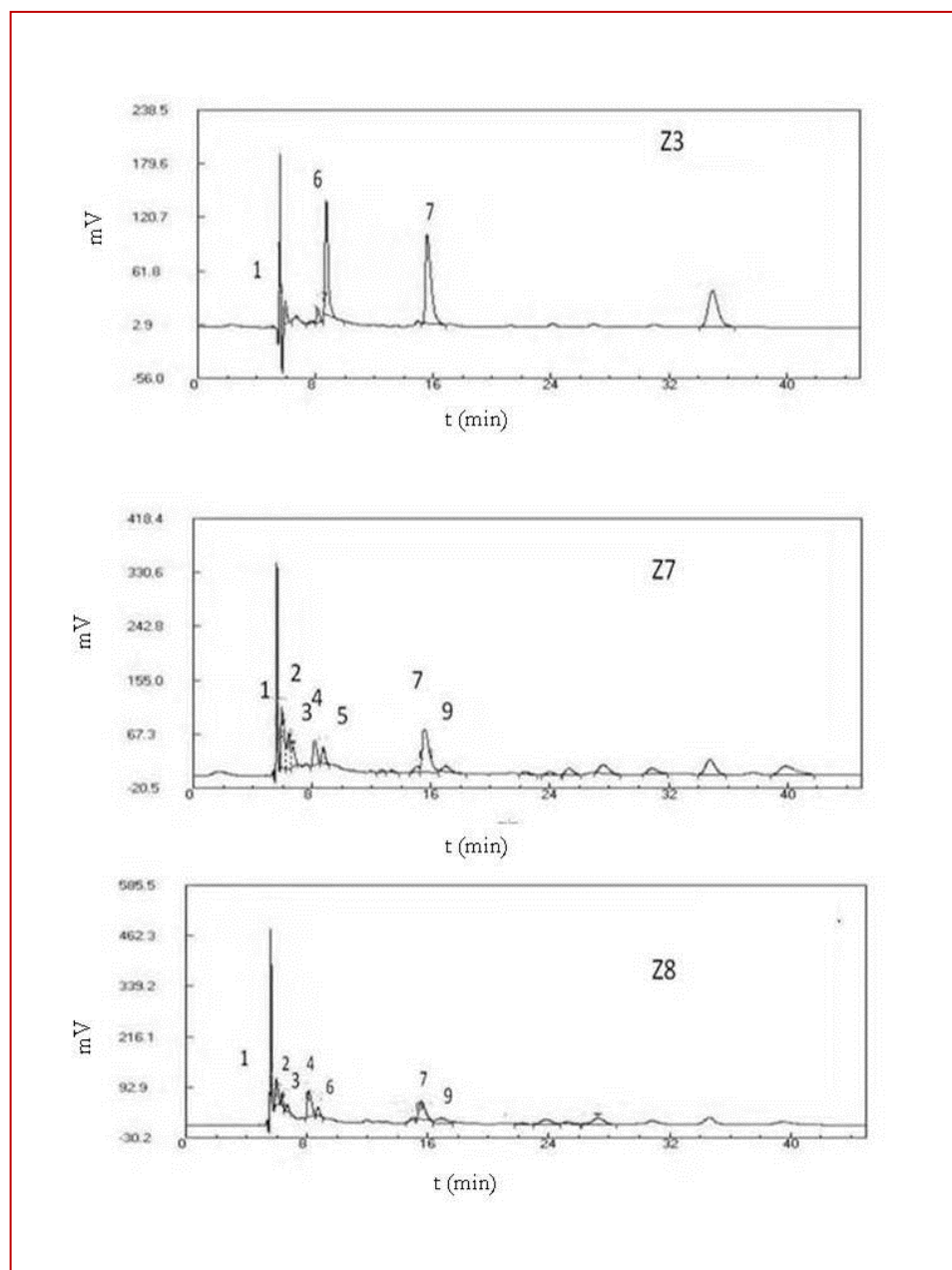


Figura 9.1. Perfiles cromatográficos de los ácidos orgánicos en los zumos, donde 1 es ácido oxálico, 2 ácido tartárico, 3 ácido quínico, 4 ácido málico, 5 ácido ascórbico, 6 ácido siquímico, 7 ácido cítrico, 8 ácido fumárico y 9 ácido succínico

En el tabla 9.14, se puede apreciar que no todos los ácidos orgánicos se detectaron en los tres zumos, de hecho en el zumo Z3, se detectaron, concretamente, ácido oxálico, ácido málico y ácido cítrico, este último con la mayor concentración del mismo entre los zumos.

Tabla 9.14: Composición de ácidos orgánicos en zumos, expresados en mg ácido/100 ml de muestra

Muestra	Lote	Oxálico	Tartárico	Quínico	Málico	Siquímico	Cítrico	Fumárico	Succínico
Z3	1	27,36 ± 2,34 ^a	n.d	n.d	100,77 ± 2,92 ^a	n.d	881,99 ± 12,51 ^b	n.d	n.d
	2	22,78 ± 0,19 ^a	n.d	n.d	119,42 ± 1,12 ^b	n.d	845,95 ± 36,40 ^b	n.d	n.d
	3	28,60 ± 4,67 ^a	n.d	n.d	106,05 ± 0,43 ^a	n.d	749,17 ± 8,50 ^a	n.d	n.d
Z7	1	14,46 ± 0,50 ^b	375,80 ± 3,95 ^c	266,88 ± 39,93 ^a	203,00 ± 4,18 ^c	2,27 ± 0,11 ^a	456,63 ± 28,45 ^b	n.d	388,58 ± 10,70 ^c
	2	9,73 ± 0,48 ^a	296,52 ± 16,83 ^b	277,08 ± 4,93 ^a	180,81 ± 6,96 ^b	2,45 ± 0,14 ^a	490,98 ± 5,07 ^b	n.d	353,05 ± 18,08 ^b
	3	12,36 ± 1,88 ^b	212,22 ± 7,81 ^a	371,30 ± 54,40 ^b	157,60 ± 1,72 ^a	2,30 ± 0,20 ^a	341,66 ± 22,35 ^a	n.d	239,35 ± 5,45 ^a
Z8	1	45,11 ± 2,91 ^b	123,84 ± 4,21 ^a	377,50 ± 7,46 ^a	231,04 ± 9,92 ^a	n.d	174,53 ± 6,52 ^a	0,35 ± 0,07 ^a	n.d
	2	19,35 ± 0,29 ^a	386,28 ± 62,88 ^c	462,36 ± 12,25 ^b	274,31 ± 15,33 ^a	n.d	186,81 ± 10,23 ^a	0,71 ± 0,02 ^b	n.d
	3	24,43 ± 0,45 ^a	272,78 ± 51,03 ^b	584,32 ± 60,05 ^c	496,62 ± 26,16 ^b	n.d	164,27 ± 16,60 ^a	1,21 ± 0,07 ^c	n.d

Letras distintas en cada columna en cada uno de los zumos evaluados (Z3, Z7 y Z8) indican diferencias estadísticamente significativas entre sus lotes.

El ácido cítrico fue el ácido mayoritario en los zumos Z3 y Z7, aunque en mucha mayor proporción en el primero, ya que representa el 86 % del total del contenido en ácidos orgánicos, mientras que para el zumo Z7 constituye un 27 % del total de ácidos orgánicos.

El zumo Z3 según su etiquetado es un zumo exprimido compuesto por naranja (80 %) y mango (20 %). En zumos frescos de naranja se ha detectado ácido cítrico con diferentes concentraciones de 12,66 g ácido cítrico/l (equivalente a 1266,0 mg ácido cítrico/100 ml) (Kelebek et al. 2009) y 2,807 g ácido cítrico/l (280,7 mg ácido cítrico/100 ml) (Cunha et al. 2002), además ha de tenerse en cuenta que contiene zumo de mango en el que se ha determinado 3 g ácido cítrico/l de ácido cítrico (300 mg ácido cítrico/100 ml) (Duarte et al. 2005). Los valores obtenidos 749,17 a 881,99 mg ácido cítrico/100 ml en el zumo Z3, se encuentran las cifras mencionadas y ha de tenerse en cuenta que las cantidades de ácidos en los zumos de fruta son bastante variables, dependiendo de la variedad, estación, métodos de procesado y tiempo de almacenamiento (Cámara et al. 2011).

En el zumo Z7 compuesto por zumos de uva roja, granada y grosella negra, como se mencionó anteriormente, su ácido mayoritario detectado fue el ácido cítrico, su rango de concentración entre los lotes varió entre 341,66 y 490,98 mg ácido cítrico/100 ml. Este ácido ha sido detectado en zumos comerciales de uva 0,327 g ácido cítrico/l (que equivalen a 327 mg ácido cítrico/100 ml) (Ehling y Cole, 2011), en zumo de granada comerciales se han detectado cantidades de 12,33 g ácido cítrico/l (1233,0 mg ácido cítrico/100 ml) (Ehling y Cole, 2011) y 0,153 y 0,221 g ácido cítrico/100 ml (153,0 a 221,0mg ácido cítrico/100 ml) (Legua et al. 2012), mientras que en zumos frescos de grosella negra fue detectado el ácido cítrico con concentraciones comprendidas entre 2,59 y 3,74 g ácido cítrico/l (259,0 y 374,0 mg ácido cítrico/100 ml) (Zheng et al. 2009), por este motivo la concentración de ácido cítrico determinada en Z7, se sitúa por encima de las concentraciones determinadas en zumo de uva.

En el zumo Z8 su ácido mayoritario es el ácido quínico con una variación entre 377,50 a 584,32 mg ácido quínico/100 ml. El zumo Z8 está compuesto por zumo de acerola (7 %) y frutos rojos (uva, grosella y cereza (83 %), frambuesa, fresa y mora (10 %)). El ácido quínico fue determinado en zumo de uva por Ehling y Cole, (2011), con una concentración de 3,63 mg ácido quínico/l (0,363 mg ácido quínico/100 ml), y por Zheng et al. (2009) entre 1 y 4 mg ácido quínico/l (0,10 y 0,40 mg ácido quínico/100 ml) en zumo fresco de grosellas negras.

En cambio, en grosellas negras Romero-Rodríguez et al. (1992), obtuvieron diferentes concentraciones según la variedad de grosella negra analizada, así en la variedad Tifón obtuvieron 51,4, en Troll 113,6 y en la variedad Tsema obtuvieron un rango de concentración entre 136,6 a 148,0 mg ácido quínico/100 g expresados en sustancia fresca.

Las variaciones en los distintos lotes de ácido quínico podrían deberse a que los zumos de grosella presentes en el zumo Z8 fueran de diferentes variedades.

Se encontró una gran variabilidad en la concentración del ácido tartárico entre los lotes del zumo Z7 (212,22 a 375,80 mg ácido tartárico/100 ml) y mayor aún entre los correspondientes al zumo Z8 (123,84 a 386,28 mg ácido tartárico/100 ml). En zumos de uva comerciales se han encontrado concentraciones de ácido tartárico entre 2302 a 3555 mg ácido tartárico/l (230,2 y 355,5 mg ácido málico/100 ml) (Mato et al. 2007), situándose los valores obtenidos en los zumos Z7 y Z8 cercanos a estas concentraciones, teniendo en cuenta que el Z7 está compuesto por un 65 % de zumo de uva y en el Z8 el zumo de uva, junto con los de grosella y cereza, constituyen el 83 %.

Como se puede observar tanto en la tabla 9.15 como en la tabla 9.16 el néctar N13 es el único producto en el que se ha detectado la presencia de los ácidos oxálico, tartárico, quínico, málico, siquímico, cítrico, fumárico y succínico. Este hecho puede ser debido a que, aunque sólo contiene un porcentaje en zumos y purés del 55 %, además de bayas (frambuesa, mora, cereza, grosella) y uva tinta, también contiene zumos o puré de manzana y granada.

El ácido mayoritario en los tres néctares analizados fue el ácido cítrico. En el néctar N11 compuesto por un 40 % de zumo de naranja (su contenido total en zumo es del 66 %), los tres lotes presentan un rango de concentración menor 415,03 a 502,81 mg ácido cítrico/100 ml de néctar a los determinados por Cunha et al. (2002) en néctares de naranja, 6,03 a 7,57 g ácido cítrico/l (603,0 y 757,0 mg ácido cítrico/100 ml). El contenido tan elevado en ácido cítrico en el N12, compuesto por un 40 % de piña, con un rango de 844,3 a 962,73 mg ácido cítrico/100 ml, supera al rango de concentraciones determinado en néctares de piña: 0,190 a 0,323 g/100 ml (que equivalen a 190,0 a 323,0 mg ácido cítrico/100 ml) por Cámara et al. (1995), pero ha de tenerse en cuenta que además de por un 40 % de zumo de piña el néctar N12 también está compuesto por un 18 % de zumo de grosella negra, en el cual se han determinado 23,75 g ácido cítrico/l (2375,0 mg ácido cítrico/100 ml) (Viljakainen et al. 2002).

En la figura 9.2, como ejemplo se ha puesto un perfil de un lote de cada néctar, ya que los perfiles no variaron entre los lotes aunque sí lo hizo alguna de las concentraciones de los ácidos orgánicos presentes en cada néctar (tabla 9.15).

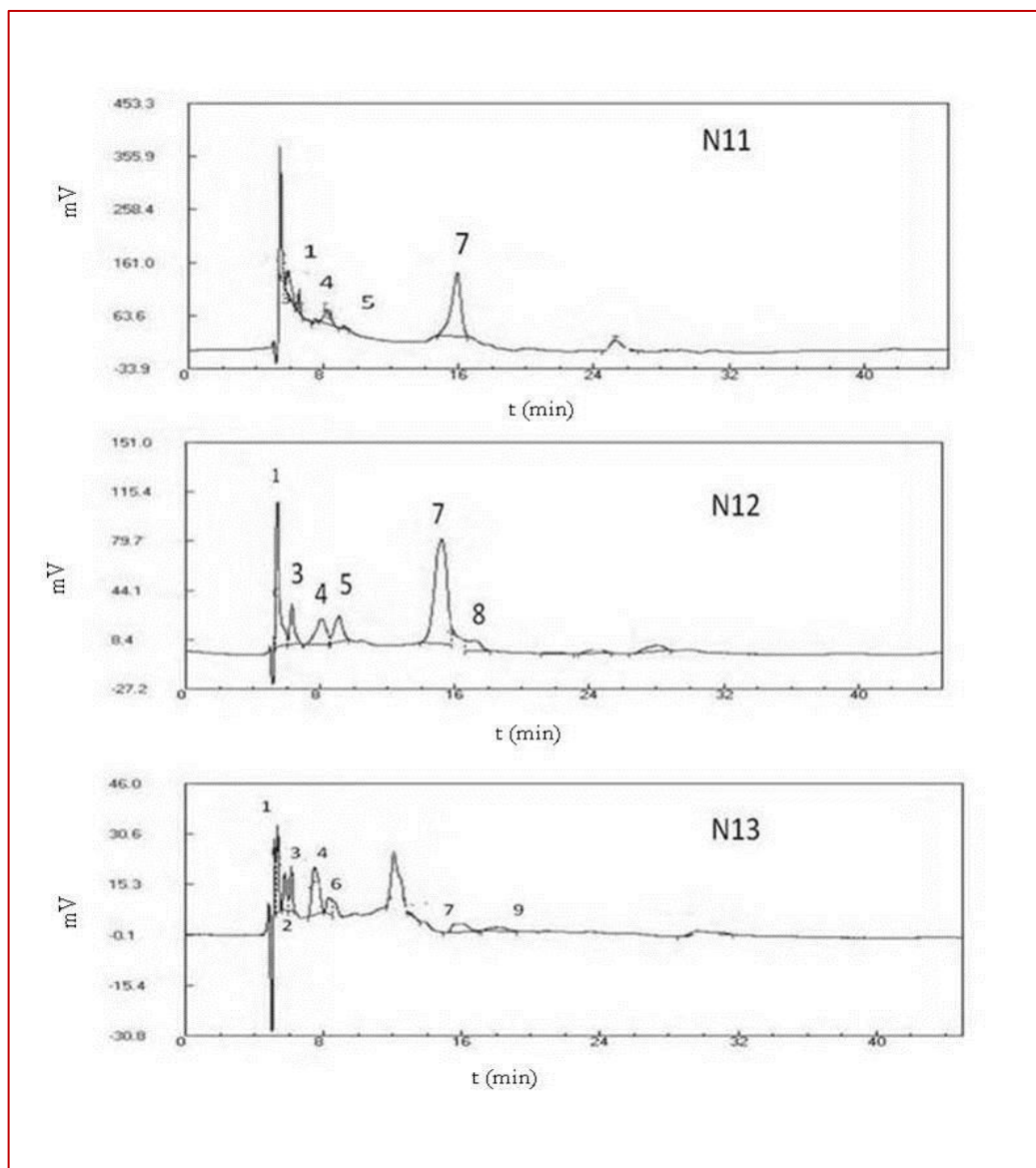


Figura 9.2. Perfiles cromatográficos de los ácidos orgánicos en los néctares, donde 1 ácido oxálico, 2 ácido tartárico, 3 ácido quínico, 4 ácido málico, 5 ácido ascórbico, 6 ácido siquímico, 7 ácido cítrico, 8 ácido fumárico y 9 ácido succínico

Tabla 9.15: Composición de ácidos orgánicos en néctares, expresados en mg ácido/100 ml de muestra

Muestra	Lote	Oxálico	Tartárico	Quínico	Málico	Siquímico	Cítrico	Fumárico	Succínico
N11	1	16,32 ± 0,28 ^b	N. D	92,92 ± 0,61 ^c	70,85 ± 0,81 ^a	n.d	502,81 ± 33,90 ^b	n.d	n.d
	2	14,24 ± 0,57 ^a	N. D	66,88 ± 4,76 ^b	58,52 ± 8,13 ^a	n.d	438,38 ± 34,35 ^{ab}	n.d	n.d
	3	13,23 ± 0,85 ^a	N. D	50,36 ± 0,62 ^a	58,11 ± 11,45 ^a	n.d	415,03 ± 14,34 ^b	n.d	n.d
N12	1	22,92 ± 1,60 ^a	N. D	120,29 ± 14,23 ^a	257,97 ± 5,57 ^a	n.d	876,39 ± 20,11 ^a	n.d	185,81 ± 22,10 ^a
	2	20,49 ± 0,22 ^a	N. D	188,37 ± 0,92 ^b	241,95 ± 10,28 ^a	n.d	962,73 ± 9,07 ^b	n.d	185,31 ± 3,54 ^a
	3	27,62 ± 1,43 ^b	N. D	167,91 ± 1,67 ^b	257,97 ± 5,57 ^a	n.d	844,30 ± 28,02 ^b	n.d	186,49 ± 15,98 ^a
N13	1	9,08 ± 0,43 ^b	40,76 ± 1,68 ^b	152,81 ± 0,34 ^b	321,65 ± 25,69 ^a	1,91 ± 0,07 ^a	431,44 ± 3,46 ^c	0,14 ± 0,00 ^a	154,07 ± 5,24 ^b
	2	7,13 ± 0,30 ^a	19,06 ± 0,96 ^a	104,87 ± 2,95 ^a	295,82 ± 17,94 ^a	1,71 ± 0,11 ^a	289,43 ± 4,26 ^a	0,13 ± 0,12 ^a	157,01 ± 2,98 ^b
	3	12,05 ± 0,60 ^c	42,44 ± 3,57 ^b	197,24 ± 2,33 ^c	292,78 ± 19,06 ^a	2,02 ± 0,09 ^a	332,49 ± 7,52 ^b	0,37 ± 0,05 ^b	148,29 ± 6,93 ^a

Letras distintas en cada columna en cada uno de los néctares evaluados (N11, N12 y N13) indican diferencias estadísticamente significativas entre sus lotes.

Los tres lotes del néctar N13 presentan contenidos de ácido cítrico que difieren entre sí de forma estadísticamente significativa, como corresponde a las proporciones variables de zumos y purés que se indican en su etiquetado. Así el rango en el cual se ha determinado el ácido cítrico entre 289,43 a 431,44 mg ácido cítrico/100 ml, podría deberse a diferentes proporciones de zumo de granada ya que, como se ha mencionado anteriormente, se han determinados rangos de concentración en ácido cítrico en zumo de granada entre 1233,0 y 153,0 mg ácido cítrico/100 ml (Ehling y Cole, 2011; Legua et al 2012).

Además del ácido cítrico destaca el ácido málico tanto en el néctar N13 (304,37 mg ácido málico/100 ml) como en el néctar N12 (252,63 mg ácido málico/100 ml). El ácido málico es el ácido orgánico mayoritario en los néctares de manzana para los que se han encontrado valores comprendidos entre 4,620 y 4,907 g ácido málico/l (462,0 y 490,7 mg ácido málico/100 ml) (Cunha et al. 2002) y en la composición del N13 se declara zumo a base de concentrado de manzana. Los valores encontrados en N12 se aproximan más a los correspondientes néctares de piña con cifras comprendidas entre 0,086 a 0,325 g ácido málico/100 ml (86,0 a 325,0 mg ácido málico/100 ml) (Cámara et al. 1995), siendo esta fruta la que compone el néctar N12 en mayor proporción.

En la tabla 9.16 están los resultados de las seis muestras analizadas. Destaca la presencia de ácido siquímico en dos muestras, concretamente en el néctar N13 y el zumo Z7. El ácido siquímico ha sido detectado en zumo fresco de manzana entre 0,3 y 4,6 mg ácido siquímico/l (0,03 a 0,4 mg ácido siquímico/100 ml), dependiendo de la variedad (Eisele y Drake, 2005), y en zumo de granada iraní 0 a 47,4 mg ácido siquímico/100 g (Aarabi et al. 2008). Además el contenido determinado en ácido siquímico entre diferentes variedades de grosella: roja 352,5, blanca 280,6 y negra 26,5 mg ácido siquímico/kg (Mikulic-Petkovsek et al. 2012), difieren en un orden de magnitud.

Por tanto, es posible que el néctar N13 contenga zumo o puré de manzana de la variedad con mayor contenido en ácido siquímico, que este néctar contenga zumo de una variedad distinta de grosella, o que las variedades de la granada para el zumo de granada en el zumo Z7 o para el zumo concentrado que compone el N13 sean distintas.

Tabla 9.16: Composición de ácidos orgánicos en las muestras, expresados en mg ácido/100 ml muestra

Muestra	Oxálico	Tartárico	Quínico	Málico	Siquímico	Cítrico	Fumárico	Succínico
	Zumos							
Z3	26,41 ± 3,45 ^b	n.d	n.d	107,61 ± 8,59 ^a	n.d	818,05 ± 63,91 ^d	n.d	n.d
Z7	11,96 ± 2,18 ^a	286,04 ± 65,08 ^b	326,44 ± 60,08 ^a	183,05 ± 18,35 ^b	2,37 ± 0,15 ^b	438,21 ± 56,84 ^c	n.d	364,89 ± 23,57 ^c
Z8	34,79 ± 12,54 ^c	226,69 ± 121,96 ^b	460,84 ± 95,92 ^b	333,99 ± 124,43 ^c	n.d	175,20 ± 14,18 ^a	0,72 ± 0,38 ^b	n.d
	Néctares							
N11	14,60 ± 1,49 ^a	n.d	69,60 ± 1,29 ^a	61,60 ± 9,41 ^a	n.d	459,32 ± 48,58 ^c	n.d	n.d
N12	23,68 ± 3,32 ^b	n.d	157,72 ± 33,03 ^c	252,63 ± 10,10 ^c	n.d	894,47 ± 55,960 ^c	n.d	185,87 ± 7,52 ^a
N13	9,47 ± 2,32 ^a	33,25 ± 11,95 ^a	143,65 ± 43,42 ^b	304,37 ± 23,34 ^d	1,91 ± 0,15 ^a	378,20 ± 43,81 ^b	0,22 ± 0,11 ^a	153,42 ± 6,01 ^a

Letras distintas en cada columna entre zumos y néctares indican diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los productos

9.4.5. Polifenoles totales y familias

Para realizar las determinaciones de polifenoles totales y familias polifenólicas, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, antocianinas monoméricas totales y color polimérico en las 6 muestras seleccionadas se procedió según se muestra en el esquema 9.1 y se he detallado anteriormente en los métodos de análisis.

Los polifenoles estimados en los zumos de fruta por distintos autores contienen una amplia variedad de resultados dependiendo del tipo o los tipos de frutas que constituyen el zumo. En este tipo de productos se han realizado gran número de estudios en la cuantificación de los polifenoles totales, por el método de Folin-Ciocalteu, y más recientemente también cuantificación total por el método Fast Blue BB. Como ejemplos en el zumo de granada comercial, se obtuvieron unos valores de polifenoles de 85 mg gálico/100 ml por el Folin-Ciocalteu y 240 mg gálico/100 ml por el Fast Blue BB, en el zumo de granada y cereza, se determinaron unos valores de 194 mg gálico/100 ml y 419 mg gálico/100 ml (Medina 2011b).

Para la determinación de polifenoles totales en estas muestras se empleó el método Fast Blue BB, desarrollado por Medina (2011b), ya que el uso del reactivo Folin-Ciocalteu para evaluar los fenoles totales ha recibido varias críticas relativas a que sus resultados, la mayoría de las veces, están sobreestimados debido a sus interferencias (Wootton-Beard y Ryan, 2011).

El método Fast Blue BB se basa en el acoplamiento de los compuestos fenólicos con la sal de diazonio obteniéndose complejos azoicos (Medina, 2011a). Los iones de diazonio aromáticos atacan al electrón de un grupo reactivo (-OH) produciéndose una sustitución electrófila, en condiciones medianamente básicas (Medina, 2011b), formando azo complejos estables que pueden medirse espectrofotométricamente a 420 nm (Lester et al., 2012).

El acoplamiento se produce en posición *para* al grupo fenólico activado, si estuviese ocupada se produciría en posición *orto* respecto al grupo hidroxilo activado (Medina, 2011b), estas posiciones están favorecidas por el medio básico en el que se produce la reacción (Zollinger, 2004).

Para comprobar la interferencia o no de la presencia de ácido ascórbico en el desarrollo de la reacción se realizó un ensayo simultáneo, con el Folin-Ciocalteu y el Fast Blue BB, con distintas concentraciones de ácido ascórbico entre el intervalo de valores de ácido ascórbico obtenidos en el primer muestreo, es decir, entre 0,68 y 134,7 mg ácido ascórbico/100 ml.

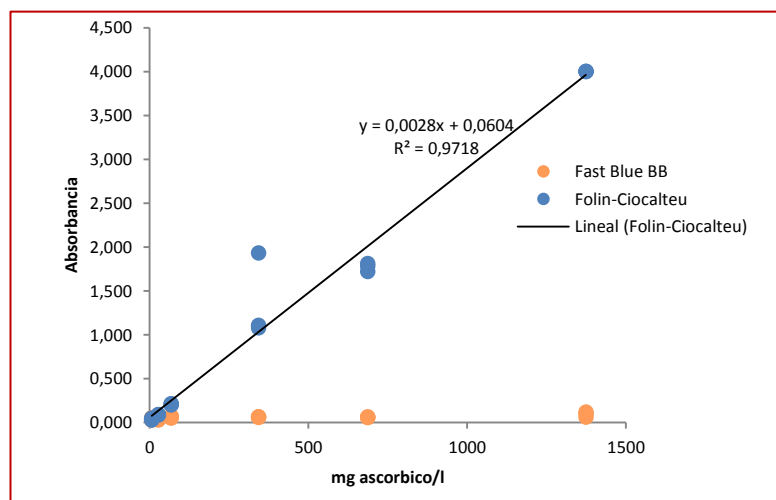


Gráfico 9.6: Relación entre el ácido ascórbico con los métodos Fast Blue BB y Folin-Ciocalteu

Al observar el gráfico 9.6, donde se representa la absorbancia en ambos métodos en relación con la concentración de ácido ascórbico, se ve que la variación en el método Fast Blue BB, es prácticamente despreciable, en comparación con el Folin-Ciocalteu, para el que se observa en este caso una tendencia lineal.

De este modo, el método Folin-Ciocalteu se utilizó como un método de evaluación más de la capacidad antioxidante y no como un método de estimación de polifenoles totales. Para determinar este parámetro se empleó el método Fast Blue BB.

El ensayo basado en sales de diazonio presenta unos valores mayores de ácido gálico equivalente, comparados con los obtenidos mediante el Folin-Ciocalteu, lo que en algunas muestras puede representar ratios comprendidos de 1-4. Un ratio inferior a 1 indica que la muestra presenta cantidades de un antioxidante no polifenólico (Medina, 2011a).

Los resultados de los polifenoles totales y familias se muestran por lote en las tablas 9.17 para los zumos y 9.18 para los néctares y por muestra en la tabla 9.19.

Tabla 9.17: Evaluación del contenido en polifenoles totales y familias polifenólicas en zumos

Muestra	Lote	Fast Blue BB mg ácido gálico/l	Hidroxiбенzoicos mg ácido gálico/l	Hidroxicinámicos mg ácido ferúlico/l	Flavonoles mg quercetina/l	Antocianinas mg cianidin-3- glucosido/l	% color polimérico
Z3	1	626,55 ± 13,97 ^b	527,33 ± 8,07 ^a	195,96 ± 2,95 ^a	180,83 ± 11,95 ^a	n.d	77,90 ± 1,40 ^a
	2	543,40 ± 6,57 ^a	531,46 ± 8,77 ^a	223,42 ± 5,52 ^b	215,98 ± 9,28 ^b	n.d	89,91 ± 3,19 ^b
	3	668,91 ± 8,77 ^c	521,29 ± 3,81 ^a	204,95 ± 8,28 ^a	192,17 ± 10,82 ^a	n.d	81,45 ± 2,43 ^a
Z7	1	3121,67 ± 61,18 ^b	612,45 ± 14,64 ^a	107,60 ± 7,17 ^a	153,13 ± 7,82 ^a	96,51 ± 5,84 ^a	34,78 ± 0,91 ^a
	2	2801,09 ± 6,68 ^a	657,16 ± 7,16 ^b	197,04 ± 4,86 ^b	169,61 ± 5,99 ^a	90,52 ± 3,20 ^a	34,71 ± 0,17 ^a
	3	3094,44 ± 62,70 ^b	686,90 ± 7,32 ^c	181,88 ± 8,87 ^b	152,68 ± 11,12 ^a	110,11 ± 2,71 ^b	42,36 ± 1,15 ^b
Z8	1	2898,75 ± 6,44 ^b	573,45 ± 8,32 ^b	153,89 ± 3,53 ^a	150,87 ± 5,27 ^b	8,02 ± 0,36 ^b	74,51 ± 0,95 ^{ab}
	2	4322,48 ± 73,99 ^c	752,72 ± 2,67 ^c	158,06 ± 3,37 ^a	173,65 ± 2,62 ^c	10,29 ± 0,17 ^b	75,01 ± 2,15 ^b
	3	2226,64 ± 4,16 ^a	506,61 ± 0,33 ^a	161,63 ± 4,66 ^a	108,69 ± 1,39 ^a	2,86 ± 1,96 ^a	70,84 ± 1,57 ^a

Letras distintas en cada columna en cada uno de los zumos evaluados (Z3, Z7 y Z8) indican diferencias estadísticamente significativas entre sus lotes.

Tabla 9.18: Evaluación del contenido en polifenoles totales y familias polifenólicas en néctares

Muestra	Lote	Fast Blue BB mg ácido gálico/l	Hidroxibenzoicos mg ácido gálico/l	Hidroxicinámicos mg ácido ferúlico/l	Flavonoles mg quercetina/l	Antocianinas mg cianidin-3- glucosido/l	% color polimérico
N11	1	733,90 ± 8,58 ^a	417,25 ± 10,80 ^a	158,49 ± 1,90 ^b	135,38 ± 1,93 ^a	n.d	80,46 ± 0,84 ^a
	2	927,72 ± 33,46 ^c	415,37 ± 13,90 ^a	148,84 ± 1,10 ^a	143,00 ± 5,76 ^{ab}	n.d	79,84 ± 0,33 ^a
	3	830,59 ± 1,66 ^b	477,82 ± 7,13 ^b	155,54 ± 2,40 ^b	146,43 ± 3,44 ^b	n.d	80,22 ± 0,81 ^a
N12	1	2069,01 ± 26,19 ^b	494,29 ± 3,92 ^b	86,60 ± 12,59 ^a	151,62 ± 11,34 ^a	45,64 ± 1,72 ^c	61,82 ± 3,50 ^a
	2	1545,83 ± 31,64 ^a	504,02 ± 1,99 ^b	102,93 ± 7,61 ^a	163,41 ± 7,82 ^a	14,58 ± 1,49 ^a	70,52 ± 0,32 ^b
	3	1596,53 ± 51,61 ^a	466,52 ± 10,59 ^a	123,69 ± 7,12 ^b	168,61 ± 7,01 ^a	21,04 ± 0,85 ^b	70,93 ± 1,35 ^b
N13	1	1403,37 ± 18,29 ^a	399,05 ± 4,49 ^a	108,42 ± 7,38 ^a	95,16 ± 3,91 ^a	36,46 ± 1,55 ^a	43,48 ± 1,73 ^b
	2	1549,25 ± 1,97 ^b	436,71 ± 12,24 ^b	108,48 ± 3,48 ^a	88,26 ± 4,89 ^a	49,48 ± 1,88 ^b	40,24 ± 1,60 ^a
	3	1524,14 ± 12,89 ^b	408,47 ± 15,23 ^a	109,70 ± 1,21 ^a	91,61 ± 1,21 ^a	52,10 ± 1,31 ^b	46,41 ± 0,67 ^c

Letras distintas en cada columna en cada uno de los néctares evaluados (N11, N12 y N13) indican diferencias estadísticamente significativas entre sus lotes.

El contenido en polifenoles presentó una gran variación interlote en el zumo Z8, con diferencias estadísticamente significativas entre los 3 lotes, de hecho el contenido en el lote 2 prácticamente duplicó al valor obtenido en el lote 3. Estas diferencias entre los lotes en el zumo Z8, también se apreciaron en el contenido de ácidos hidroxibenzoicos, flavonoles y antocianinas, mientras que en ácidos hidroxicinámicos no presentaron diferencias. Como se ha mencionado anteriormente estas diferencias pueden ser debidas a la composición variable de este producto.

Los zumos Z3 y Z7, sólo presentaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido en polifenoles totales, en el zumo Z3 y en los ácidos hidroxibenzoicos en el zumo Z7.

En cambio en el análisis de los néctares (tabla 9.18), sus resultados fueron más homogéneos, de hecho sólo el contenido en polifenoles totales en el néctar N11 y el contenido en antocianinas monoméricas en N12, mostraron diferencias estadísticamente significativas.

La tabla 9.19 muestra claramente que los productos con mayor proporción de zumos o purés de frutos rojos presentaron valores mucho más elevados de polifenoles totales. Al comparar los resultados del zumo Z3, con respecto a los otros dos zumos (Z7 y Z8), estos quintuplicaron su valor, y con respecto al valor del N11, los valores de los néctares N12 y N13 fueron cercanos al doble de su valor.

Si comparamos a su vez los zumos con mayor proporción de frutos rojos en su composición, Z7 y Z8, con los valores obtenidos en los néctares N12 y N13 (mayor composición de frutos rojos), estos resultados en zumos fueron prácticamente el doble. Esta misma diferencia entre zumos y néctares fue observada por Medina (2011b) en la evaluación de los polifenoles totales en zumo y néctar de grosella negra, donde el contenido del zumo (261 mg ácido gálico/100 ml) prácticamente duplicaba al néctar (120 mg ácido gálico/100 ml).

El valor obtenido en el zumo Z3, 626,68 mg ácido gálico/l, es superior al obtenido por Medina (2011b) en zumo de naranja fresco, 20 mg ácido gálico/100 ml (200,0 mg ácido gálico/l).

Atendiendo en primer lugar a las familias fenólicas, se observa que los mayores resultados obtenidos corresponden a los ácidos hidroxibenzoicos. Este hecho está de acuerdo con la opinión realizada por Manach et al. (2004), sobre el alto contenido en ácidos hidroxibenzoicos que poseen las frutas rojas.

El mayor valor determinado en los ácidos hidroxicinámicos fue en el Z3 en los zumos y en el N11 en los néctares, con un valor medio de 206,19 y 153,76 mg ácido ferúlico/l respectivamente, como se aprecia en los tres lotes analizados.

En las antocianinas monoméricas totales el mayor valor obtenido, fue determinado en el zumo Z7 seguido por el N13. Ambos productos, junto con el zumo Z8, son los que mayor proporción de frutas rojas presentan en su composición. El zumo Z7 con 99,06 mg cianidin-3-glucósido/l de muestra, está dentro del rango de los resultados obtenidos entre 25 zumos de uva evaluados por Fröhling et al (2012), con valores comprendidos entre 14,1 y 197,5 mg cianidin-3-glucósido/l.

En las antocianinas se detectó una amplia variabilidad entre los distintos lotes. El néctar N13, presenta una composición variable, indica en su etiquetado “en proporción variable”, con lo que es posible una variación en la concentración de los distintos componentes. En el caso del néctar N12, esta variación no puede ser atribuida a la variación en la composición del néctar, pero si podría ser debido a la variación en el contenido de antocianinas de los zumos de frutas concentrados de grosella y ciruela, ya que los antocianinas pueden variar por diversas causas durante la maduración de las frutas o diferencias en el contenido en polifenoles entre las distintas variedades de las que provenga el zumo concentrado empleado en la elaboración del néctar (Fröhling et al. 2012) o también esta variación puede ser debida al procesado de la frutas en la obtención de los zumos y tanto almacenamiento tanto del producto final como de los zumos concentrados de partida (Rein y Heinonen, 2004; Brownmiller et al. 2008; Hager et al. 2008a; Hager et al. 2008b).

De hecho el contenido en antocianinas puede verse influenciado por diversos factores como el pH, la temperatura de almacenamiento, la presencia de enzimas, luz, la estructura y concentración de las antocianinas y la presencia de otros compuestos fenólicos (Rein y Heinonen, 2004).

En el néctar N11 no se detectaron antocianinas monoméricas en ninguno de sus lotes pero su porcentaje de color polimérico parece indicar algún tipo de degradación.

La variación que experimentan las antocianinas en relación tanto al tratamiento térmico como al almacenamiento ha sido estimada en el caso de los productos derivados de los arándanos azules alrededor del 40 %. Además de un incremento del color polimérico, lo que indica un aumento de la polimerización de las antocianinas (Brownmiller et al. 2008). El incremento de color polimérico durante el procesado y almacenamiento ha sido comprobado en derivados de frambuesa negra (Hager et al. 2008b) y en derivados de mora (Hager et al. 2008a).

Este mismo hecho podría haber sucedido en el zumo Z8, ya que además de contener un número inferior a las antocianinas totales de los que les corresponderían por los zumos y purés de bayas que contiene, su amplio rango de fecha de caducidad en comparación con los otros dos zumos analizados indica que en su procesado debe llevar un tratamiento térmico, y presenta un porcentaje de color polimérico elevado en comparación con los otros productos en los que se han detectado antocianinas monoméricas.

Si se comparan los datos entre el contenido total de antocianinas monoméricas y el porcentaje de color polimérico hallado en cada una de las muestras analizadas, se observa claramente que a menor valor de antocianinas mayor es el porcentaje de color polimérico determinado, destacando principalmente las dos muestras N11 y Z3 en las que el color polimérico se sitúa por encima del 80 % mientras que las antocianinas no pudieron ser detectadas. Ambos métodos presentaron una correlación Antocianinas/% color polimérico de -0,900 con una $p < 0,01$ (tabla 9.24), lo que indica su correlación inversamente proporcional.

Tabla 9.19: Evaluación del contenido en polifenoles totales y familias polifenólicas por muestra

Muestra	Fast Blue BB mg ácido gálico/l	Hidroxibenzoicos mg ácido gálico/l	Hidroxicinámicos mg ácido ferúlico/l	Flavonoles mg quercetina/l	Antocianinas mg cianidin-3- glucosido/l	% color polimérico
Zumos						
Z3	626,68 ± 59,47 ^a	523,01 ± 11,46 ^a	208,11 ± 13,18 ^b	196,33 ± 18,10 ^b	n.d	83,09 ± 5,75 ^c
Z7	3031,32 ± 150,16 ^b	636,60 ± 54,56 ^b	158,42 ± 43,16 ^a	157,71 ± 10,63 ^a	99,05 ± 9,41 ^b	37,28 ± 3,88 ^a
Z8	3006,34 ± 857,80 ^b	575,49 ± 106,8 ^b	157,85 ± 4,76 ^a	144,40 ± 28,70 ^a	7,38 ± 2,84 ^a	73,78 ± 2,30 ^b
Néctares						
N11	842,84 ± 82,91 ^a	436,81 ± 32,19 ^a	153,76 ± 4,54 ^b	142,38 ± 5,88 ^b	n.d	80,17 ± 0,67 ^c
N12	1737,12 ± 252,05 ^c	484,50 ± 17,67 ^b	104,40 ± 18,06 ^a	161,21 ± 10,79 ^c	27,09 ± 14,25 ^a	67,76 ± 4,84 ^b
N13	1491,92 ± 76,06 ^b	414,74 ± 19,71 ^a	108,86 ± 4,16 ^a	91,67 ± 4,36 ^a	46,01 ± 7,39 ^b	43,38 ± 2,94 ^a

Letras distintas en cada columna (familia) en cada uno de los productos (zumos y néctares) indican diferencias estadísticamente significativas.

9.4.6. Capacidad antioxidante

Para evaluar la capacidad antioxidante de los zumos y néctares se seleccionaron cinco métodos *in vitro*, debido a que cada uno de los ensayos de evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* está basado en principios distintos, lo que implica que los resultados obtenidos para cada uno de ellos sean distintos, y sea necesaria la realización de varios ensayos (Ryan y Prescott, 2010).

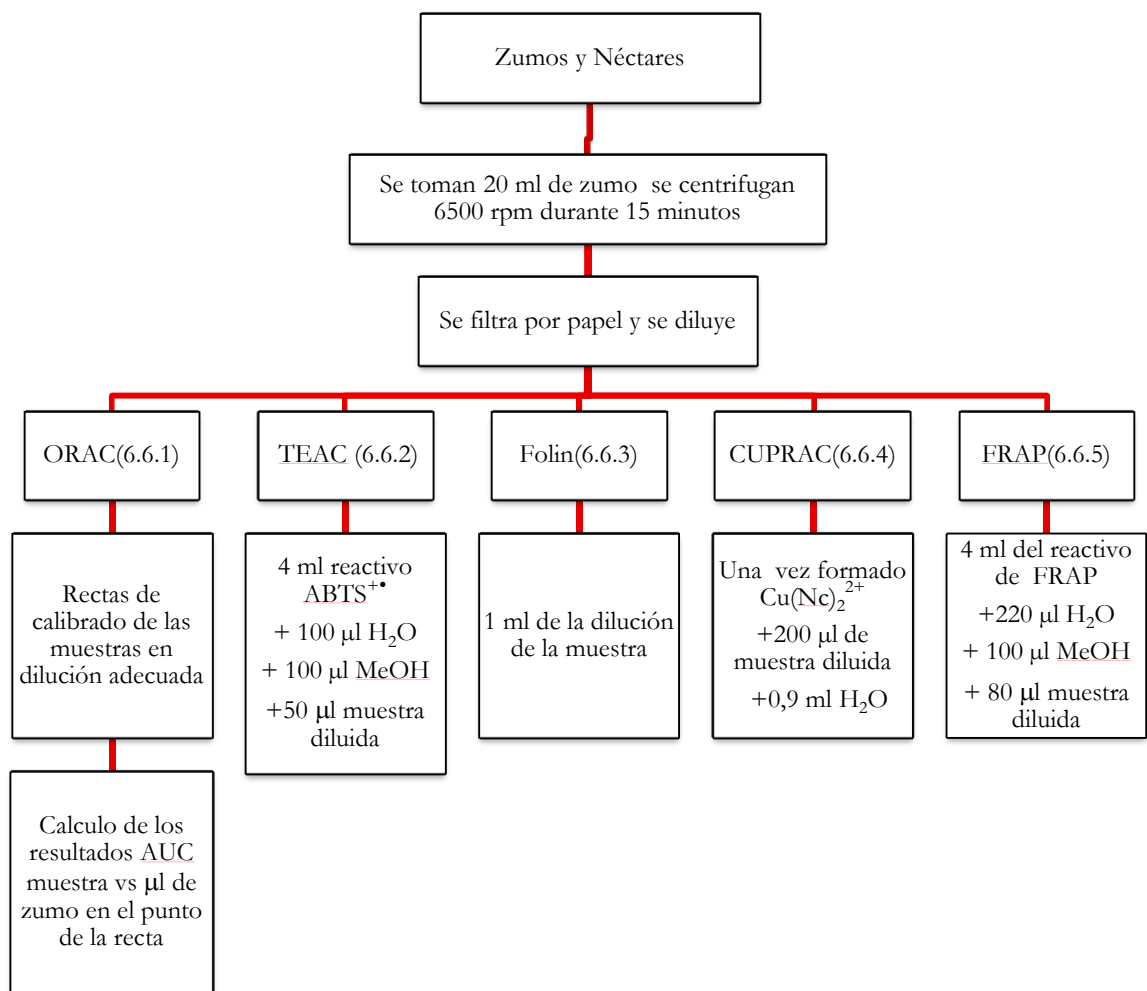
El mecanismo químico redox para uno de ellos, ORAC, es transferencia de átomo de hidrógeno, mientras que los otros cuatro son de transferencia electrónica. Además también otros investigadores como Schlesier et al. (2002) aconsejan que se empleen métodos con más de un estándar. En este caso se escogió el método de sustancias reductoras totales (Folin), empleando el reactivo Folin-Ciocalteu, que utiliza el ácido gálico, en lugar del trolox empleado como estándar en los otros cuatro métodos empleados en este estudio.

En cuanto a la aproximación química que utilizan los otros ensayos, es diferente en el caso del TEAC, ya que es un ensayo de inhibición frente al FRAP y al CUPRAC, que son ensayos de capacidad reductora. Entre estos dos últimos ensayos la diferencia radica en el mayor potencial de reducción del ion férrico, con respecto al ion cúprico.

Los resultados se expresaron en mmol trolox equivalente (TE)/l para los métodos ORAC, TEAC; CUPRAC y FRAP, y en mg ácido gálico/l para el Folin.

Los procedimientos aplicados a la evaluación de la capacidad antioxidante de las muestras se detallan esquemáticamente a continuación:

Esquema 9.3: Metodología de la evaluación de la capacidad antioxidante en zumos y néctares



Los resultados se recogen en las tablas 9.20 y 9.21, de los zumos y néctares por lote respectivamente, y expresado por muestra en la tabla 9.22.

Tabla 9.20: Evaluación de la capacidad antioxidante en zumos

Muestra	Lote	Folin mg ácido gálico/l	TEAC mmol TE/l	FRAP mmol TE/l	CUPRAC mmol TE/l	ORAC mmol TE/l
Z3	1	1181,69 ± 24,33 ^a	8,76 ± 0,42 ^a	7,82 ± 0,05 ^b	2,89 ± 0,00 ^a	8,10 ± 0,21 ^a
	2	959,14 ± 16,08 ^b	10,69 ± 0,39 ^b	7,50 ± 0,18 ^a	5,17 ± 0,15 ^b	10,56 ± 0,42 ^b
	3	1019,51 ± 10,76 ^c	9,01 ± 0,37 ^a	7,28 ± 0,18 ^b	5,13 ± 0,13 ^b	9,98 ± 0,57 ^b
Z7	1	1324,97 ± 52,38 ^a	14,07 ± 0,59 ^a	7,32 ± 0,32 ^a	12,38 ± 0,30 ^{ab}	17,44 ± 0,68 ^b
	2	1281,34 ± 47,62 ^a	15,03 ± 0,15 ^a	11,72 ± 0,31 ^c	11,93 ± 0,16 ^a	15,68 ± 0,46 ^a
	3	1461,71 ± 5,77 ^b	14,20 ± 0,71 ^a	8,44 ± 0,14 ^b	12,81 ± 0,02 ^b	17,83 ± 0,39 ^b
Z8	1	1304,47 ± 23,96 ^a	14,60 ± 0,53 ^b	7,31 ± 0,16 ^b	10,04 ± 0,39 ^b	22,06 ± 1,38 ^a
	2	1791,90 ± 87,12 ^b	17,68 ± 0,34 ^c	12,43 ± 0,22 ^c	15,18 ± 0,18 ^c	28,56 ± 0,18 ^c
	3	1247,15 ± 21,86 ^a	11,66 ± 0,32 ^a	6,72 ± 0,20 ^a	8,54 ± 0,23 ^a	15,13 ± 0,41 ^a

Letras distintas en cada columna en cada uno de los zumos evaluados (Z3, Z7 y Z8) indican diferencias estadísticamente significativas entre sus lotes.

Tabla 9.21: Evaluación de la capacidad antioxidante en néctares

Muestra	Lote	Folin mg ácido gálico/l	TEAC mmol TE/l	FRAP mmol TE/l	CUPRAC mmol TE/l	ORAC mmol TE/l
N11	1	859,50 ± 28,86 ^b	9,06 ± 0,74 ^a	4,41 ± 0,20 ^b	5,79 ± 0,25 ^b	11,48 ± 0,32 ^b
	2	692,80 ± 21,10 ^a	7,11 ± 0,06 ^a	5,68 ± 0,26 ^c	4,17 ± 0,02 ^a	9,73 ± 0,23 ^a
	3	664,58 ± 8,82 ^a	8,50 ± 0,14 ^b	3,52 ± 0,08 ^a	7,47 ± 0,07 ^c	9,43 ± 0,53 ^a
N12	1	873,32 ± 0,45 ^a	8,90 ± 0,45 ^a	4,74 ± 0,27 ^b	6,65 ± 0,41 ^a	14,42 ± 0,22 ^b
	2	850,77 ± 0,06 ^a	9,28 ± 0,06 ^a	4,25 ± 0,02 ^a	8,15 ± 0,02 ^b	11,82 ± 0,48 ^a
	3	746,04 ± 47,83 ^a	10,13 ± 0,29 ^b	4,17 ± 0,01 ^a	7,24 ± 0,36 ^a	11,58 ± 0,64 ^a
N13	1	575,12 ± 16,66 ^a	9,14 ± 0,27 ^a	3,72 ± 0,38 ^a	7,70 ± 0,18 ^b	9,38 ± 0,72 ^a
	2	723,49 ± 1 2,02 ^b	10,04 ± 0,69 ^b	4,18 ± 0,11 ^a	7,82 ± 0,22 ^b	9,49 ± 0,82 ^a
	3	741,38 ± 12,64 ^b	10,04 ± 0,27 ^b	5,25 ± 0,10 ^b	7,18 ± 0,14 ^a	10,85 ± 0,72 ^a

Letras distintas en cada columna en cada uno de los néctares evaluados (N11, N12 y N13) indican diferencias estadísticamente significativas entre sus lotes.

Uno de los principales hechos que destacan en la tabla 9.21 para los distintos lotes de los zumos evaluados es que se obtiene un orden distinto según el método empleado en su evaluación; como ejemplo el lote 2 del zumo Z3 es el menor resultado obtenido para el Folin mientras que es el mayor resultado obtenido en el TEAC en este zumo.

El zumo Z3 es el que presentó resultados más homogéneos entre sus lotes, de hecho sólo en el Folin sus tres lotes presentaron diferencias estadísticamente significativas. Aunque la menor variabilidad se produjo en el TEAC para el zumo Z7, en el que sus tres lotes no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

De la misma forma que en el contenido de polifenoles totales y familias polifenólicas el lote 2 del zumo Z8 presenta unos valores notablemente superiores a los otros lotes de este zumo evaluados, presentando en todos ellos diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros dos lotes.

En general la capacidad antioxidante de los néctares es menor que la de los zumos, aunque se encuentran excepciones en algunos lotes concretos de algunos néctares. Así los tres lotes en el ORAC del néctar N12 presentan mayor capacidad antioxidante según el método ORAC que los del zumo Z3.

La variación del lote 1 el néctar N11 (tabla 9.21), apreciado en los métodos Folin y ORAC, donde el lote 1, en el que se ha determinado una concentración mayor de ácido ascórbico presenta diferencias estadísticamente significativas con los otros dos lotes analizados (2 y 3).

Tabla 9.22: Evaluación de la capacidad antioxidante por muestra

Muestra	Folin mg ácido gálico/l	TEAC mmol TE/l	FRAP mmol TE/l	CUPRAC mmol TE/l	ORAC mmol TE/l
Zumos					
Z3	1053,45 ± 0,88 ^a	9,42 ± 0,93 ^a	7,56 ± 0,26 ^a	4,61 ± 1,06 ^a	9,64 ± 1,22 ^a
Z7	1356,00 ± 188,90 ^b	14,44 ± 0,65 ^b	8,89 ± 2,01^a	12,32 ± 0,41^b	16,98 ± 1,09 ^b
Z8	1447,84 ± 263,37^b	14,65 ± 2,63^b	8,82 ± 2,81 ^a	11,25 ± 3,03 ^b	21,92 ± 5,86^c
Néctares					
N11	744,73 ± 97,43 ^a	8,34 ± 0,98 ^a	4,53 ± 0,96 ^a	5,80 ± 1,35 ^a	10,21 ± 1,02 ^a
N12	841,50 ± 53,37 ^b	9,46 ± 0,65 ^b	4,38 ± 0,30 ^a	7,33 ± 0,67 ^b	12,66 ± 1,39 ^b
N13	680,00 ± 79,95 ^a	9,70 ± 0,57 ^a	4,36 ± 0,67 ^a	7,57 ± 0,33 ^b	9,91 ± 0,96 ^a

Letras distintas en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas.

En tabla la 9.22 se puede apreciar que el método de sustancias reductoras totales (Folin), proporciona una valoración inicial adecuada de la capacidad antioxidante. Tanto por lotes como por muestra, respecto a este ensayo, se aprecia que los valores obtenidos en los zumos son prácticamente el doble que en los néctares.

El método de sustancias reductoras totales, o capacidad antioxidante evaluado por el reactivo Folin-Ciocalteu, es sin duda un buen método para establecer una comparación entre distintas muestras analizadas.

De todos los métodos empleados en la evaluación de la capacidad antioxidante, el que menor variación mostró entre las muestras es el ensayo FRAP con un rango comprendido entre 4,36 y 8,89 mmol TE/l. Al observar la tabla 9.22 se aprecia además que en los valores obtenidos en este ensayo los zumos prácticamente duplican a los néctares.

Los valores de los néctares para este ensayo, se encuentran en el mismo rango de magnitud que los obtenidos por Álvarez et al. (2014), para zumos de naranja 4,45 y 10,8 mmol TE/l y similares a los obtenidos por Saura-Calixto y Goñi, (2006), en zumo de naranja 515 μ mol TE/100 ml (5,15 mmol TE/l), e inferiores a los obtenidos por Moreno-Montoro et al. (2014) en zumo de uva de 9,16 mmol TE/l.

El método CUPRAC presentó un mayor rango de variación, entre 4,61 y 12,32 mmol TE/l, si comparamos con valores obtenidos en zumos frescos de manzana 3,39 y 9,74 mmol TE/l (Karaman et al. 2010), todos los valores obtenidos en las muestras analizadas se han encontrado en este rango de magnitud a excepción de los zumos Z8 y Z7, que presentan unos valores ligeramente superiores.

Los resultados obtenidos en el ensayo TEAC son similares a los hallados por Seeram et al. (2008), que obtuvieron para zumos comerciales de granada 41,6 mmol TE/l, en varios zumos de uva 14,9-21,7 mmol TE/l, en zumo de naranja 4,4-5,0 mmol TE/l y para zumo de cereza 11,4-17,8 mmol TE/l. Si atendemos a la distinta composición de las muestras evaluadas, se puede observar que el Z7 (compuesto por uva, granada y grosella negra), se encuentra en el rango de los valores obtenidos.

Si comparamos los valores del ORAC, con otros zumos, encontramos semejanzas con los obtenidos por Seeram et al. (2008), para zumo de uva tinta que tienen un valor medio de 25,9 mmol TE/l, en cambio si los comparamos con los obtenidos por Borges et al. (2010), en zumo de granada, con un rango entre 35,2 a 83,17 mmol TE/l, son inferiores.

Sin embargo, son superiores a los obtenidos en zumo de naranja por Seeram et al. (2008) con valores medios de 7,4 mmol TE/l; incluso los néctares presentaron valores superiores en este ensayo.

Si comparamos los resultados obtenidos en el ensayo con otros zumos mixtos analizados, se han detectado valores, para el método Folin, en un zumo mixto compuesto por granada, uva y aronia de 6,7 mmol ácido gálico/l (Borges et al. 2010), y en un zumo tropical se ha detectado 5 mmol ácido gálico/l aproximadamente (Mullen et al. 2007), lo que equivaldría respectivamente, a 1139,80 y 850,6 mg ácido gálico/l. Estos resultados son comparables con los obtenidos en el caso de los zumos Z7 y Z8, y en Z3, ya que aunque la composición sea distinta sí proporciona la tendencia de que en los zumos que contiene frutas rojas presentan mayores valores en Folin que los zumos que no los contienen.

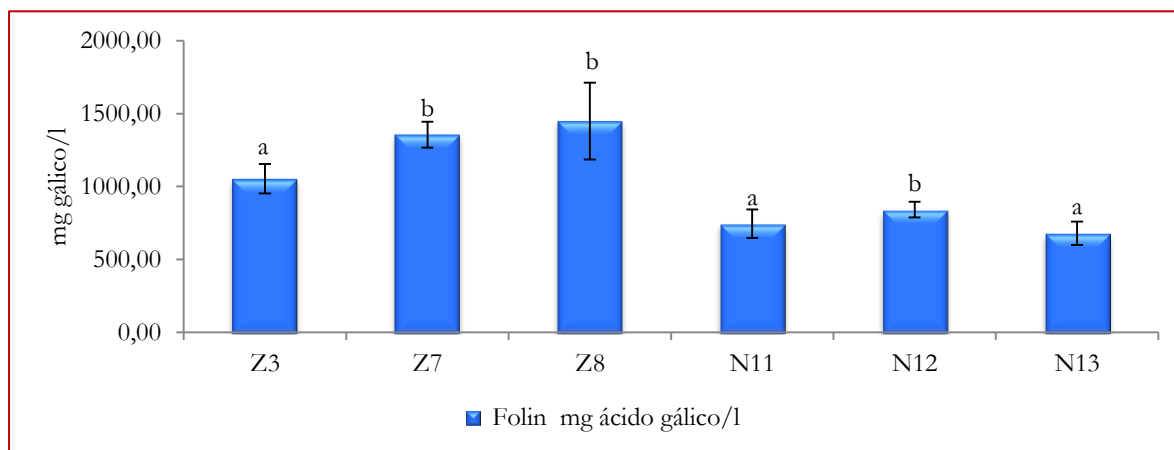


Gráfico 9.7: Evaluación de la capacidad antioxidante por Folin-Ciocalteu

Esta tendencia en el método Folin en los zumos no se dio en los néctares, principalmente por dos razones, la primera aunque el néctar N11 que contiene la menor proporción en zumo de frutos rojos fue el producto en el que se determinó mayor contenido en ácido ascórbico, con un valor de $69,10 \pm 2,96$ mg ácido ascórbico/100 ml.

Además con respecto a la composición en zumo concentrado del néctar N11 es de un 66 % (zumos concentrados naranja (36 %), frambuesa (15 %), zanahoria (8 %), grosella negra (5 %) y acerola (2 %)), mientras que el néctar N13 con un 55 % de composición en zumos o purés concentrados de frutos rojos y manzana, no se determinó contenido en vitamina C y presenta un 11 % menos de contenido en zumos de frutas.

En los néctares sólo se observó esta tendencia en los métodos TEAC y CUPRAC, ya que los resultados de la capacidad antioxidante en los cinco métodos evaluados depende de la composición, y el néctar N13 (mayor variedad de frutas rojas presenta en su composición), contiene un 11 % menos de zumo de fruta que el néctar N11 y además ha de tenerse en cuenta la contribución del ácido ascórbico a la capacidad antioxidante.

La tendencia observada en la cual los zumos compuestos por frutos rojos presentaron mayor capacidad antioxidante que aquellos que no los contienen, caso del zumo Z3 compuesto por naranja y mango, es más notable en los métodos ORAC, TEAC, y CUPRAC. Los valores obtenidos en los zumos Z7 y Z8, fueron prácticamente el doble que los obtenidos por el Z3, mientras que en el CUPRAC los resultados de los zumos Z7 y Z8 fueron prácticamente el triple.

Al comparar los resultados por muestra de la evaluación de la capacidad antioxidante, tabla 9.22, no se puede establecer un orden claro entre las muestras, ya que éste sería distinto según se aplica un método u otro. Así observamos que el valor mayor de capacidad antioxidante en los métodos Folin, TEAC y ORAC, correspondió al zumo Z8 mientras que en los métodos CUPRAC y FRAP, los valores más altos fueron obtenidos por el zumo Z7. Este mismo hecho sucede en relación al producto con menor capacidad antioxidante, de hecho para los métodos Folin y FRAP fue el néctar N13, para el TEAC el néctar N11 y para los métodos CUPRAC y ORAC el zumo Z3.

Para poder comparar la capacidad antioxidante de las seis muestras analizadas entre sí, con los cinco métodos empleados, se utilizó el índice de potencial antioxidante compuesto (IPA compuesto), que como se ha mencionado anteriormente se calculó mediante el cálculo previo del IPA de cada muestra en cada uno de los cinco ensayos realizados (mediante la ecuación 6.4) y aplicando la media aritmética de los cinco índices obtenidos en cada muestra.

En la tabla 9.23 se muestran los índices de cada método empleado para cada muestra y los IPA compuestos para cada una de las seis muestras estudiadas.

Tabla 9.23: Índice de potencial antioxidante

	Folin Índice	TEAC Índice	FRAP Índice	CUPRAC Índice	ORAC Índice	IPA compuesto
Z3	72,8	64,3	85,0	37,4	44,0	60,7
Z7	93,7	98,6	100,0	100,0	77,5	94,0
Z8	100,0	100,0	99,2	91,3	100,0	98,1
N11	51,4	56,9	51,0	47,1	46,6	50,6
N12	58,1	64,6	49,3	59,5	57,8	57,9
N13	47,0	66,2	49,0	61,4	45,2	53,8

En la tabla 9.23 se observa claramente que los índices de potencial antioxidante entre las muestras son superiores en los zumos, aunque en el caso del zumo Z3 su IPA compuesto fue $60,7 \pm 19,8$, sólo supera al índice del néctar más alto, N12 $57,9 \pm 5,5$, en 3 unidades mientras que los valores de los otros dos zumos son cercanos al doble que en los néctares.

El IPA compuesto de los zumos y néctares analizados se representa gráficamente en el gráfico 9.8, en el que se observa claramente cómo los índices de los zumos Z7 y Z8 no presentan diferencias entre ellos y que en los tres néctares en la valoración global de la capacidad antioxidante de los tres néctares se han obtenido resultados similares.

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados obtenidos, usando este modo de comparación de las muestras, en conjunto el zumo Z8 con un índice de $98,1 \pm 3,8$ presenta la capacidad antioxidante más alta evaluada por los cinco métodos empleados, su resultado es comparable con el zumo Z7 con un valor de $94,0 \pm 9,6$ y en el néctar N11 se obtuvo el índice de potencial antioxidante menor con un valor de $50,6 \pm 4,1$.

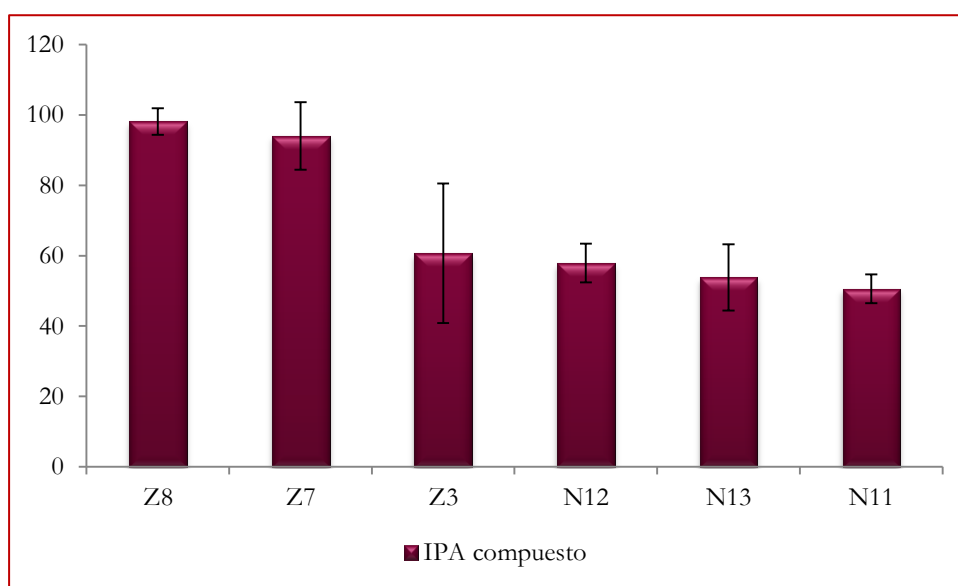


Gráfico 9.8: Índice de potencial antioxidante compuesto por muestra

En el gráfico 9.9, se realizó el estudio de las diferencias de los métodos evaluados en cada muestra analizada, comparando así los resultados de los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante.

Unos de los hechos que más ha destacado es que el TEAC y el ORAC no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el zumo Z3 ni en los néctares N11 y N13.

De la misma manera en el zumo Z8 el CUPRAC no presentó diferencias estadísticamente significativas ni con el FRAP ni con el TEAC. En cambio, tanto en el zumo Z7 como en néctar N12, todos los métodos evaluados presentaron diferencias estadísticamente significativas.

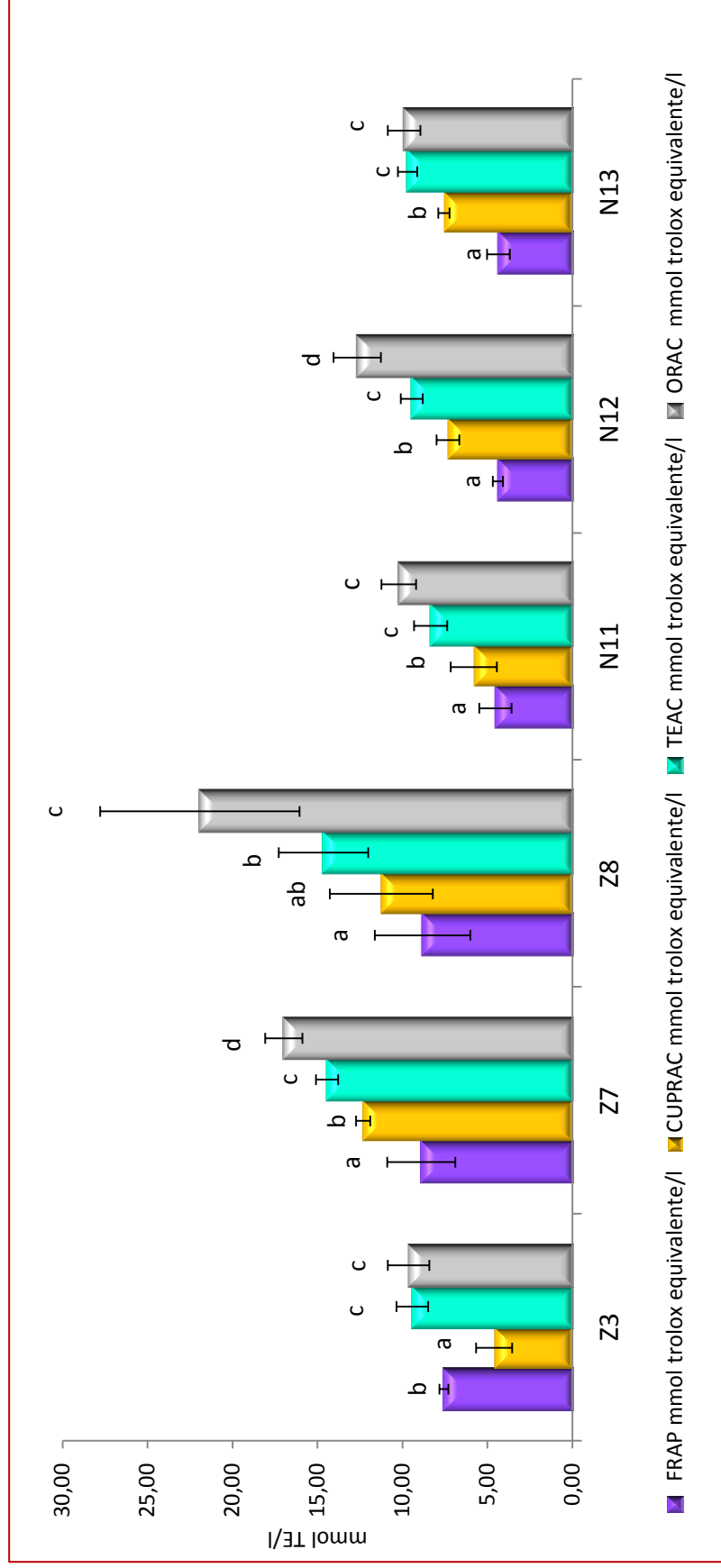


Gráfico 9.9: Comparación de métodos de evaluación de la capacidad antioxidante entre las muestras.

Como se puede observar gráficamente, hay un patrón en todas las muestras analizadas con la única excepción del método CUPRAC en el zumo Z3: los valores de la capacidad antioxidante siguen el orden $ORAC \geq TEAC \geq CUPRAC \geq FRAP$.

Análisis estadístico

Como se mencionó en el plan de trabajo se realizó una matriz de correlaciones (tabla 9.24) para observar cómo correlacionaban unos ensayos con otros. En esta matriz se comparó cada determinación realizada con el conjunto de datos obtenidos para cada uno de los lotes de las muestras analizadas.

Entre todos los métodos de capacidad antioxidante evaluados y el nuevo método de estimación de polifenoles totales (FBBB), la mayor correlación se obtuvo entre FBBB/CUPRAC 0,936 ($p < 0,01$), también muestra buena correlación con el FBBB/ORAC 0,912 ($p < 0,01$). Mientras que entre los métodos de capacidad antioxidante la mayor fue la mostrada por Folin/FRAP 0,906 ($p < 0,01$). Todas las correlaciones de Pearson se muestran en la tabla 9.24

Tabla 9.24: Tabla de Correlaciones de Pearson

	Ácido ascórbico	FBBB	HB	Antocianinas	Color polimérico	Flavonoles	HC	Folin	ORAC	CUPRAC	FRAP	TEAC
Ácido ascórbico	1,000 0,000											
FBBB	-0,294 0,031	1,000 0,000										
HB	-0,077 0,580	0,783 0,000	1,000 0,000									
Antocianinas	-0,804 0,000	0,531 0,000	0,395 0,003	1,000 0,000								
Color polimérico	0,852 0,000	-0,440 0,001	-0,162 0,242	-0,900 0,000	1,000 0,000							
Flavonoles	0,254 0,064	-0,038 0,783	0,479 0,000	-0,195 0,159	0,469 0,000	1,000 0,000						
HC	0,469 0,000	-0,160 0,246	0,370 0,006	-0,219 0,111	0,412 0,002	0,615 0,000	1,000 0,000					
Folin	0,070 0,616	0,710 0,000	0,915 0,000	0,255 0,063	-0,051 0,713	0,434 0,001	0,477 0,000	1,000 0,000				
ORAC	0,020 0,885	0,912 0,000	0,800 0,000	0,226 0,100	-0,095 0,495	0,163 0,240	0,021 0,877	0,781 0,000	1,000 0,000			
CUPRAC	-0,333 0,014	0,936 0,000	0,776 0,000	0,589 0,000	-0,496 0,000	-0,040 0,773	-0,105 0,450	0,660 0,000	0,835 0,000	1,000 0,000		
FRAP	0,056 0,690	0,630 0,000	0,863 0,000	0,247 0,072	-0,080 0,564	0,447 0,001	0,559 0,000	0,906 0,000	0,680 0,000	0,575 0,000	1,000 0,000	
TEAC	-0,176 0,203	0,897 0,000	0,868 0,000	0,445 0,001	-0,323 0,017	0,169 0,221	0,184 0,182	0,829 0,000	0,888 0,000	0,895 0,000	0,789 0,000	1,000 0,000

Siendo N (54) en todos los ensayos.

Análisis de componentes principales

Para poder caracterizar las muestras en función de las determinaciones realizadas, se realizó una reducción a componentes principales del análisis.

De la misma forma que en las correlaciones, se emplearon como variables todas las determinaciones realizadas sobre el muestreo definitivo y se produjo su reducción a tres componentes principales.

Así los tres primeros componentes explican el 82,29 % de la varianza, el primer componente explica el 40,23 %, el segundo 26,46 % y el tercero explica el 15,60 %.

Tabla 9.25: Matriz de explicación de la varianza para cada componente entre los ensayos

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de varianza	% acumulado
1	9,253	40,230	40,230
2	6,086	26,460	66,690
3	3,588	15,599	82,289
4	1,394	6,061	88,350
5	1,093	4,753	93,103
6	0,673	2,925	96,028
7	0,226	0,983	97,011
8	0,161	0,699	97,710
9	0,115	0,500	98,210
10	0,100	0,435	98,645
11	0,085	0,369	99,014
12	0,052	0,225	99,239
13	0,049	0,214	99,453
14	0,034	0,146	99,599
15	0,026	0,112	99,711
16	0,022	0,094	99,805
17	0,013	0,058	99,863
18	0,009	0,039	99,902
19	0,008	0,034	99,936
20	0,006	0,025	99,961
21	0,004	0,017	99,979
22	0,003	0,012	99,991
23	0,002	0,009	100,000

Tabla 9.26: Participación de cada variable en los componentes principales

	Componente		
	1	2	3
°Brix	0,466	0,664	0,322
pH	-0,726	0,606	-0,144
Acidez	-0,282	0,469	0,658
Ácido ascórbico (AA)	-0,434	0,683	-0,434
Ácido oxálico	-0,009	0,775	-0,126
Ácido tartárico	0,834	0,117	-0,086
Ácido quínico	0,805	0,113	-0,461
Ácido málico	0,444	-0,291	-0,547
Ácido siquímico	0,570	-0,637	0,321
Ácido cítrico	-0,574	0,057	0,625
Ácido fumárico	0,345	0,134	-0,815
Ácido succínico	0,558	-0,542	0,556
FBBB	0,943	0,142	-0,092
Ácidos hidroxibenzoicos (HC)	0,747	0,550	0,291
Ácidos hidroxicinámicos (HB)	-0,083	0,695	0,246
Ácido flavonoles	-0,145	0,757	0,556
Antocianinas	0,699	-0,483	0,475
% color polimérico	-0,634	0,695	-0,247
Folin	0,747	0,613	0,103
TEAC	0,900	0,338	0,011
FRAP	0,629	0,609	0,205
CUPRAC	0,929	0,068	-0,007
ORAC	0,789	0,445	-0,194

En la tabla 9.26 se puede observar cómo el primer componente está definido (altamente correlacionado) con los métodos TEAC, CUPRAC, los polifenoles totales (FBBB), y el ácido tartárico y el ácido quínico positivamente, mientras que el pH lo hace negativamente. El segundo componente está definido por los ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, por el ácido ascórbico, y ácido oxálico positivamente y negativamente por el ácido siquímico. El tercer componente lo caracteriza positivamente el ácido cítrico y el ácido fumárico negativamente. Mientras que todas las muestras se caracterizan por el primer componente (tabla 9.27).

Tabla 9.27: Participación de cada muestra estudiada en los componentes principales

	Componente		
	1	2	3
Z3	0,834	0,545	0,052
Z7	0,962	-0,236	-0,036
Z8	0,924	-0,314	0,211
N11	0,962	0,235	0,027
N12	0,978	-0,015	-0,094
N13	0,974	-0,153	-0,142

En el gráfico 9.10 están representados los dos primeros componentes que son los que mayor influencia tienen en la caracterización de las muestras, ya que todas las muestras analizadas definen al primer componente. Se observa además cómo los zumos Z7 y Z8, se sitúan en la misma zona que los néctares N13 y N12 (parte positiva del primer componente y negativa del segundo), mientras que el zumo Z3 y el N11 se sitúan en la parte positiva de ambos componentes.

Además, gráficamente se observa claramente cómo se agrupan las muestras con mayor proporción de frutos rojos, Z7, Z8, N13 y N12 quedando separado de ellas los productos con contenido mayoritario en naranja, Z3 y N11.

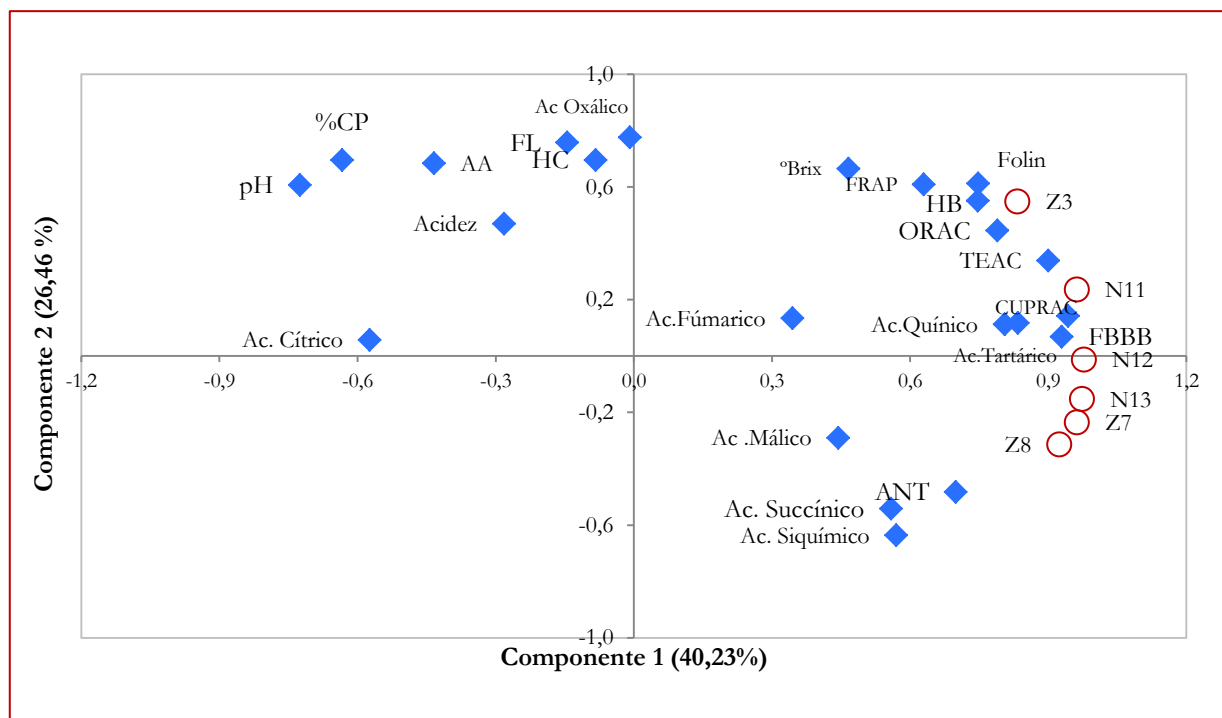


Gráfico 9.10: Representación en el plano del análisis de componentes principales

9.4.7. Valoración del etiquetado

En la primera selección, se escogieron productos que contuviesen en su etiquetado declaraciones nutricionales y declaraciones de propiedades saludables y otros productos que no las tuviesen.

El Reglamento 1924/2006, define declaración como cualquier mensaje o representación que no sea obligatorio con arreglo a la legislación comunitaria o nacional, incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica, que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee unas características específicas.

Este Reglamento define “declaración nutricional” como cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales benéficas específicas con motivo de:

- a) el aporte energético (valor calórico)
 - a) que proporciona,
 - b) que proporciona en un grado reducido o incrementado,
 - c) que no proporciona, y/o de
- b) los nutrientes u otras sustancias
 - i) que contiene,
 - ii) que contiene en proporciones reducidas o incrementadas, o
 - iii) que no contiene.

Por “declaración de propiedades saludables” cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud.

Solamente se permitirán las declaraciones de propiedades saludables si se incluye la siguiente información en el etiquetado, de no existir éste, en la presentación y la publicidad:

- a) Una declaración en la que se indique la importancia de una dieta variada y equilibrada y un estilo de vida saludable;
- b) La cantidad de alimento y el patrón de consumo requeridos para obtener el efecto benéfico declarado;
- c) En su caso, una declaración dirigida a las personas que deberían evitar el consumo del alimento, y
- d) Una advertencia adecuada en relación con los productos que pueden suponer un riesgo para la salud si se consumen en exceso.

En ambos casos el Reglamento 1924/2006, establece una serie de requisitos para evitar que los consumidores perciban estos alimentos que poseen una ventaja sobre el resto de alimentos a los que no se les han añadido estos nutrientes u otras sustancias. Para contrarrestar este posible efecto indeseable, que los consumidores tomen decisiones que influyan en su ingesta total de nutrientes, se impusieron una serie de restricciones por lo que respecta a los productos acerca de los cuales se efectúan declaraciones.

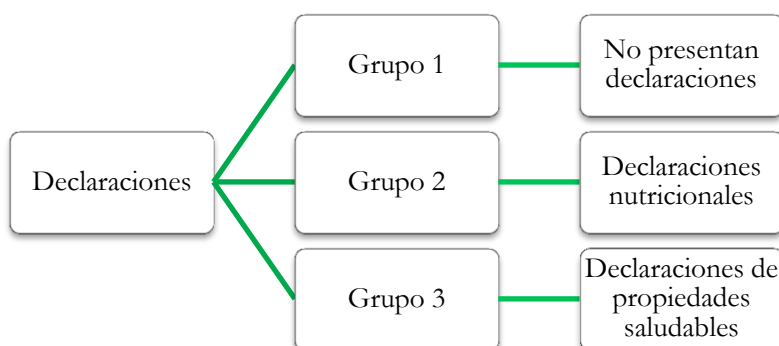
La aplicación de perfiles nutricionales como criterio debe tener el objetivo de evitar una situación en la que las estas declaraciones oculten el estado nutricional general de un producto alimenticio, lo que podría inducir a error a los consumidores al intentar tomar decisiones sanas en el contexto de una dieta equilibrada.

Aunque los perfiles nutricionales deben basarse en datos científicos generalmente aceptados también deben permitir la innovación de los productos, y deben tener en cuenta la variabilidad de los hábitos y tradiciones dietéticos, así como que determinados productos concretos pueden desempeñar un papel importante en el contexto de una dieta global.

El establecimiento de un perfil nutricional debe tener en cuenta el contenido de diferentes nutrientes y sustancias con efecto nutricional o fisiológico, en particular el de grasas, grasas saturadas, ácidos grasos *trans*, sal o sodio, y azúcares, para los que no se recomiendan ingestas excesivas en la dieta total, así como el de grasas poliinsaturadas y monoinsaturadas, hidratos de carbono disponibles diferentes de los azúcares, vitaminas, minerales, proteínas y fibras. Al establecer los perfiles nutricionales, deben tenerse en cuenta las diferentes categorías de alimentos y el lugar y la función de estos alimentos en la dieta total.

Según las definiciones establecidas por el Reglamento 1924/2006, en el muestreo original se podrían distinguir tres grupos atendiendo a sus declaraciones nutricionales o declaraciones de propiedades saludables, que se muestran en el esquema 9.4:

Esquema 9.4: Clasificación de los productos del muestreo original según su etiquetado



En un primer grupo aquellos productos que no presentan ninguna declaración en su etiquetado. En estas cuatro etiquetas, correspondientes al grupo 1 (tabla 9.28) todas ellas zumos, no se observa ninguna declaración en el etiquetado, salvo en el Z7 que contiene una frase que puede inducir a error, ya que según la legislación del zumo, Directiva 2012/112/CE y Real Decreto 781/2013, los zumos no pueden contener azúcares añadidos.

Tabla 9.28: Grupo 1: productos que no presentan declaración nutricional o declaraciones de propiedades saludables

	
Z10	Z4
	
Z3	Z7

De hecho este etiquetado en el zumo Z7 fue rectificado por el fabricante y en 2014 en la etiqueta ya no se observaba ese comentario (figura 9.3):

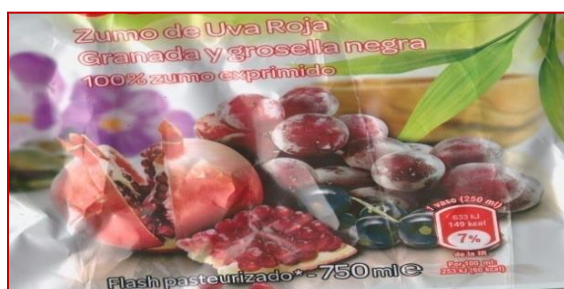


Figura 9.3: Etiqueta del zumo Z7 adquirida en el año 2014.

El Reglamento 1925/2006 estableció que la adición de una vitamina o un mineral en un alimento tendrá como resultado la presencia de dicha vitamina o mineral en el alimento en al menos una cantidad significativa, ésta se considera un 15 % de la CDR, especificada en el anexo de la Directiva 90/496/CEE, y suministrada por 100 g o 100 ml o por envase, si éste contiene una única porción. Estas cantidades sufrieron una modificación posterior en la Directiva 2008/100/CE (tabla 9.29).

Tabla 9.29: Vitaminas y minerales que pueden declararse y sus cantidades diarias recomendadas (CDR)

Sustancia	Cantidad	Sustancia	Cantidad	Sustancia	Cantidad	Sustancia	Cantidad
Vitamina A (µg)	800	Vitamina D (µg)	5	Potasio (mg)	2000	Yodo (µg)	150
Vitamina E (mg)	12	Vitamina K (µg)	75	Cloruro (mg)	800	Calcio (mg)	800
Vitamina C (mg)	80	Tiamina (mg)	1,1	Fósforo (mg)	700	Magnesio (mg)	375
Riboflavina (mg)	1,4	Niacina (mg)	16	Hierro (mg)	14	Zinc (mg)	10
Vitamina B6 (mg)	1,4	Ácido fólico (µg)	200	Cobre (mg)	1	Manganeso (mg)	2
Vitamina B12 (µg)	2,5	Biotina (µg)	50	Fluoruro (mg)	3,5	Selenio (µg)	55
Ácido pantoténico (mg)	6			Cromo (µg)	40	Molibdeno (µg)	50

Cantidad Diaria Recomendada (CDR) establecida en la Directiva 2008/100/CE

Tal y como promulga el Reglamento 1924/2006, en todas estas etiquetas pertenecientes al grupo 2, (tabla 9.30) que presentan declaraciones nutricionales, cinco de ellas en su etiquetado nutricional muestran la declaraciones nutricionales sobre su contenido en vitaminas, alegando en algunos casos “con vitaminas ...”(N15 y N14), “multivitaminas”(N16 y Z9) o “alto contenido de vitaminas” (Z2). Además como establece en el Reglamento 1924/2006, en su etiquetado nutricional aparece la cantidad de vitamina que presenta seguida del porcentaje de CDR.

Aunque formalmente el etiquetado de Z9 y N16, cumplen la legislación, si se observan detenidamente las cantidades de vitaminas, como por ejemplo la vitamina C, e encuentran concentraciones de 20 mg/100 ml (33 % CDR) y 3 mg/100 ml (25 % CDR) respectivamente. En el zumo Z9, aunque si contiene el 15 % CDR, el valor que indica el etiquetado no se corresponde con el 33 % CDR que estableció la Directiva 2008/100/CEE, sino que se refiere a la CDR de vitamina C de 60 mg/día (Directiva 90/496/CE), que se encontraba en disposición transitoria hasta el 31 de octubre de 2012. Mientras que en el caso del néctar N16 su cantidad indicada en el etiquetado es un tercio menor que el 15 % CDR. Sin embargo los resultados obtenidos en el contenido de vitamina C (tabla 9.8), fueron en el zumo Z9 contenía $34,70 \pm 0,79$ y en el néctar N16 $111,96 \pm 3,97$ mg ácido ascórbico/100 ml, con lo cual ambos productos superaron el 15 % CDR (80 mg/día), e incluso el porcentaje de CDR que indica su etiquetado correspondiente.

En el etiquetado de los néctares N14 y N15, en ambos su contenido en vitamina C se encuentra por encima del 15 % CDR, y para las otras dos vitaminas que declaran, la vitamina E y A, ambas se encuentran presentes con el 15 % CDR.

En el caso de “alto contenido en vitaminas” el Reglamento 1924/2006 establece que sólo podrá declararse que un alimento posee un alto contenido de vitaminas o minerales, si el producto contiene como mínimo dos veces el valor de la fuente, lo que se traduce como el 30 % de la CDR, y en el etiquetado el zumo Z2 indica, para la vitamina A 240 µg en 100 ml de zumo y 24 mg vitamina C en 100 ml, y la CDR para la vitamina C es de 80 mg y para la vitamina A 800 µg (Directiva 2008/100/CE), que equivale a un 30 %.

.

Tabla 9.30: Grupo 2: Productos que presentan declaraciones nutricionales

MULTIVITAMINAS

12 fuentes de vitaminas

Zumo de 12 frutas enriquecido con vitaminas C, E, B6, B2, B1 y provitamina A

No procede de concentrado

MULTIVITAMINAS

1 Multivitaminas en un delicioso cocktail de 12 frutas con un sabor original y equilibrado.

200 ml de Tropicana Pure Premium Multivitaminas aportan:

- Un completo suministro diario de VITAMINA C, esencialmente que ayuda a la protección de las células.
- El 40% de la cantidad diaria recomendada de VITAMINA A que contribuye al cuidado de la piel y los ojos.

Descubre las zonas enriquecidas de una gama de zumos que además de aportar todos los beneficios de la fruta están enriquecidos para cubrir necesidades esenciales de vitaminas, minerales y nutrientes:

CALCIO
Zumo de naranja sin pulpa enriquecido con calcio

FIBRA
En exquisito zumo de frutas y hortalizas rico en fibra.

Valor Nutritivo	Media por 100 ml	Media por 200 ml
Valor energético	51 Kcal (219 kJ)	102 Kcal (438 kJ)
Proteínas	0,3 g	0,6 g
Hidratos de Carbono	11,2 g	22,4 g
Grasas	0,1 g	0,2 g
Sodio	0,8 g	1,6 g
Fibra Alimentaria	0,3 g	0,6 g
Vitamina C	20 mg-31% CDR*	40mg-66% CDR*
Vitamina E	2mg-20% CDR*	4mg-40% CDR*
Vitamina B6	0,4mg-20% CDR*	0,8mg-40% CDR*
Vitamina B2	0,32mg-20% CDR*	0,64mg-40% CDR*
Vitamina B1	0,28mg-20% CDR*	0,56mg-40% CDR*
Vitamina A	100µg-20% CDR*	200µg-40% CDR*

* Cantidad Diaria Recomendada (CDR)
Este producto aporta a 3 veces de 100 ml.
No procede de concentrado

Cocktail de Frutas

1,5L

Información Nutricional

	Por 100 ml	% CDR*
Valor energético	224 kJ / 53 kcal	
Proteínas	< 0,5 g	
Hidratos de carbono	12,4 g	
De los cuales azúcares	< 0,2 g	
Grasas	< 0,1 g	
De las cuales saturadas	< 0,5 g	
Fibra alimentaria	0,001 g	
Sodio	0,275 mg	(25%)
Vitamina B1	0,350 mg	(25%)
Vitamina B2	0,350 mg	(25%)
Vitamina B6	0,350 mg	(25%)
Vitamina C	0,350 mg	(25%)
Vitamina E	0,350 mg	(25%)
Vitamina A	0,350 mg	(25%)

* de la Cantidad Diaria Recomendada / de la cantidad diaria recomendada

Z9

N16

TROPICAL

Medicina Tropical

Con Vitaminas A, C, E y B6

Valor nutritivo por cada 100ml

	Valor nutritivo
Valor energético	51 Kcal (219 kJ)
Proteínas	0,3 g
Hidratos de carbono	11,2 g
Grasas	0,1 g
Sodio	0,8 g
Fibra Alimentaria	0,3 g

Vitaminas A: 100 µg (20% CDR*)
 Vitaminas C: 20 mg (31% CDR*)
 Vitaminas E: 2 mg (20% CDR*)
 Vitaminas B6: 0,4 mg (20% CDR*)

Multi Vitaminas

SECTOR MULTIVITAMINAS

Con Vitaminas A, C, E y B6

Ingredientes:

Zumo de naranja, azúcar, ácido ascórbico, ácido fólico, vitamina B12, vitamina E, vitamina A, provitamina A.

Información Nutricional

	Por 100 ml	% CDR*
Valor energético	47 Kcal (197 kJ)	
Proteínas	0,3 g	
Hidratos de carbono	11,2 g	
De los cuales azúcares	10,8 g	
Grasas	0,1 g	
De las cuales saturadas	0,1 g	
Fibra	0,3 g	
Sodio	0,8 g	
Vitamina A	100 µg	(20% CDR*)
Vitamina C	20 mg	(31% CDR*)
Vitamina E	2 mg	(20% CDR*)
Vitamina B6	0,4 mg	(20% CDR*)

*CDR: Cálculo de la Cantidad Diaria Recomendada. Este valor es una estimación. Los valores reales pueden variar según la edad, el sexo, la actividad física y otros factores.

N14

N15

SIN AZÚCAR AÑADIDO

BAJO VALOR ENERGÉTICO

RICO EN FIBRA

ARÁNDANOS, GROSSELLA Y SÁLCO

GLUTEN

ARÁNDANOS

Sólo contiene azúcares naturalmente presentes.

Modo de empleo:

Apilar antes de servir.

Modo de conservación:

Mantener en lugar fresco y seco.

Una vez abierto conservarlo en el frigorífico y consumir antes de 3 días.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL

	Valor medio por cada 100ml
Valor Energético	13 Kcal (55 KJ)
Proteínas	0,1 g
Hidratos de carbono	3,7 g
De los cuales azúcares	2,6 g
Grasas	0,0 g
De las cuales saturadas	0,0 g
Fibra alimentaria	1,0 g
Sodio	0,0 g

Zumo de guayaba, níspero y goji

100% FRUTA

INFORMACIÓN NUTRICIONAL

	Por 100 ml	Por una ración de 250 ml	% CDR*
Valor energético	100 kJ	250 kJ	9%
Proteínas	0,5 g	1,3 g	3%
Hidratos de carbono	10,1 g	25,3 g	10%
De los cuales azúcares	9,8 g	24,5 g	27%
Grasas	0,1 g	0,3 g	<1%
De las cuales saturadas	0,1 g	0,3 g	0%
Fibra alimentaria	1,1 g	2,8 g	11%
Sodio	0,0 g	0,0 g	0%
Sodio	0,0 g	0,0 g	0%

Vitaminas

	Por 100 ml	Por una ración de 250 ml	% CDR*
Vitamina C (ácido ascórbico)	24 mg	60 mg	75%
Vitamina B (ácido fólico)	240 µg	600 µg	75%

*CDR: Cálculo de la Cantidad Diaria Recomendada. Este valor es una estimación. Los valores reales pueden variar según la edad, el sexo, la actividad física y otros factores.

Nutrición

	Por 100 ml	Por una ración de 250 ml	% CDR*
Valor energético	100 kJ	250 kJ	9%
Proteínas	0,5 g	1,3 g	3%
Hidratos de carbono	10,1 g	25,3 g	10%
De los cuales azúcares	9,8 g	24,5 g	27%
Grasas	0,1 g	0,3 g	<1%
De las cuales saturadas	0,1 g	0,3 g	0%
Fibra alimentaria	1,1 g	2,8 g	11%
Sodio	0,0 g	0,0 g	0%
Sodio	0,0 g	0,0 g	0%

Vitaminas

	Por 100 ml	Por una ración de 250 ml	% CDR*
Vitamina C (ácido ascórbico)	24 mg	60 mg	75%
Vitamina B (ácido fólico)	240 µg	600 µg	75%

*CDR: Cálculo de la Cantidad Diaria Recomendada. Este valor es una estimación. Los valores reales pueden variar según la edad, el sexo, la actividad física y otros factores.

B20

Z2

La bebida B20 su declaración nutricional alegada es “fuente de fibra” de hecho según su etiquetado nutricional contiene 1 g de fibra por 100 ml de bebida refrescante a base de frutas. El Reglamento 1924/2006 indica que para que un alimento pueda presentar esta declaración, o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, el producto debe contener como mínimo 3 g de fibra por 100 g o, como mínimo, 1,5 g de fibra por 100 Kcal, de hecho este producto cumple este último apartado ya que contiene 1g de fibra por 13 Kcal.

En el grupo 3 en la que se agrupan los productos que declaran propiedades saludables, se pueden distinguir a su vez dos grupos, el primero, grupo 3a, se clasificó de esta manera ya que parece que el etiquetado indica una declaración nutricional aunque en realidad presenta una declaración de propiedad saludable. Los dos primeros zumos, Z8 y Z1, alegan en su etiquetado una fuente de antioxidantes y en ambos casos esos antioxidantes se encuentran expresados en su etiquetado como polifenoles, concretamente como mg ácido gálico en 100 ml de zumo. El néctar N11 declara 80 mg de compuestos fenólicos/100 ml.

Así el Reglamento 1924/2006, en el caso de “fuente de otra sustancia” en su artículo 5 indica que solamente se autorizará el uso de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables si se cumplen las siguientes condiciones:

- a) Se ha demostrado que la presencia, ausencia o contenido reducido, en un alimento o una categoría de alimentos, de un nutriente u otra sustancia respecto del cual se efectúa la declaración posee un efecto nutricional o fisiológico benéfico, establecido mediante datos científicos generalmente aceptados;
- b) El nutriente u otra sustancia acerca del cual se efectúa la declaración:
 - i) Está contenido en el producto final en una cantidad significativa tal como se define en la legislación comunitaria o, en los casos en que no existan normas al respecto, en una cantidad que produzca el efecto nutricional o fisiológico declarado, establecido mediante datos científicos generalmente aceptados, o
 - ii) No está presente o está presente en una cantidad reducida que produzca el efecto nutricional o fisiológico declarado, establecido mediante datos científicos generalmente aceptados;

- c) Cuando sea pertinente, el nutriente u otra sustancia sobre el cual se efectúa la declaración se encuentra en una forma asimilable por el organismo;
- d) La cantidad del producto que cabe razonablemente esperar que se consuma proporciona una cantidad significativa del nutriente u otra sustancia a que hace referencia la declaración, tal como se define en la legislación comunitaria o, en los casos en que no existan normas al respecto, una cantidad significativa que produzca el efecto nutricional o fisiológico declarado, establecido mediante datos científicos generalmente aceptados.

En la actualidad todavía hay muchas lagunas en nuestro conocimiento y hay un gran número de polifenoles estructuralmente diferentes que pueden ser relevantes para la salud, y la obtención de información suficiente para establecer una dosis diaria recomendada de cada uno de ellos no parece previsible en un futuro cercano (Landete, 2013), ya que aún sólo han sido aprobados y certificados algunos métodos analíticos para la determinación de los polifenoles, a diferencia de vitaminas y minerales (Williamson y Holst, 2008).

El zumo Z8 y el néctar N11 parece que si cumplen la legislación, en referencia a su declaración nutricional, "fuente de vitamina C", ya que según los criterios establecidos, esta cantidad constituye el 15 % CDR para la vitamina C para que pueda considerarse el zumo fuente de vitamina C, en el caso del néctar N11 que alega un contenido en 60 mg en 100 ml especifica que es el 100 % de la CDR, este etiquetado al igual que ocurre en el zumo Z9 se encontró dentro de la disposición transitoria de la anterior Directiva 90/496/CEE, así que su valor especificado corresponde con los 60 mg ácido ascórbico/día que estableció esta directiva.

En cambio las alegaciones referidas a fuente o contenido en polifenoles que se encuentran tanto en Z1 como en Z8 expresados como mg ácido gálico por 100 ml (12 y 30 mg/100 ml respectivamente) y en N11 en mg/100 ml de compuestos fenólicos (80 mg/100 ml) no están permitidas según el Reglamento 1924/2006, y no están reflejadas en el Reglamento 432/2012 en la lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables.

En el caso de los otros dos zumos Z6 y Z5, su declaración es "fuente natural de antioxidante", al observar su etiquetado nutricional ninguno de los dos hace mención a ningún antioxidante determinado.

Tabla 9.31: Grupo 3A Productos que presenta declaraciones de propiedades saludables expresadas como fuente natural

Z8

N11

Z1

Z5

Z6

En el grupo 3B (tabla 9.32) todos ellos presentan declaraciones de propiedades saludables en referencia al contenido en frutas que contienen antioxidantes, N12 y B19 presentan exactamente la misma alegación “Contiene antioxidantes naturales de las frutas (“medidos como compuestos fenólicos”), y como establece la legislación también figura una declaración en la que se indique la importancia de una dieta variada y equilibrada y un estilo de vida saludable, con la siguiente afirmación “el consumo diario de un vaso de 250 ml de Antiox, junto con una dieta variada y equilibrada aporta antioxidantes naturales”.

Las bebidas B17 y B18, declaran en el etiquetado “frutas con antioxidantes naturales”, de hecho en su etiquetado nutricional expresan el contenido en polifenoles y comparándolas con el etiquetado anterior, mencionan que “es el complemento ideal para una dieta sana”.

En relación al último néctar de este grupo, N13, presenta sin duda la declaración de propiedad saludable más arriesgada desde el punto de vista legal, “un vaso de 250 ml aporta la mitad de la capacidad antioxidante diaria recomendada”. No existe en la actualidad ninguna CDR para la capacidad antioxidante.

Todas estas declaraciones que presentan los productos englobados en el grupo 3B no están permitidas según el Reglamento 1924/2006, ni en sus modificaciones posteriores.

Otra alegación “sin azúcares añadidos” (N13) ya que el producto analizado es un néctar y éstos por definición llevan azúcar añadido y en este producto se ha sustituido por edulcorantes. Desde el punto de vista de la declaración nutricional esta alegación es correcta, al igual que la presentada en la bebida B20 (tabla 9.30), pero esta declaración no es posible desde el 28 de abril de 2015, fecha en que terminó la disposición transitoria del Real Decreto 781/2013. A partir de ese momento, puede declararse que no se han añadido azúcares a un néctar de frutas, si no se ha añadido al producto ningún monosacárido ni disacárido, ni ningún alimento utilizado por sus propiedades edulcorantes, incluidos los edulcorantes definidos en el Reglamento (CE) 1333/2008. Si los azúcares están naturalmente presentes en los néctares de frutas, en el etiquetado deberá figurar asimismo la siguiente indicación: “contiene azúcares naturalmente presentes” (Directiva 2012/12/UE; Real Decreto 781/2013).

El etiquetado del N13 fue comprobado visualmente, en fecha posterior al 28 de abril de 2015 y no figura la declaración “sin azúcares añadidos”.

Estos Reglamentos han sido modificados en la actualidad por la nueva Directiva 1169/2011 que, como se ha mencionado anteriormente, modifica tanto el Reglamento 1924/2006 como el Reglamento 1925/2006 y que son de obligado cumplimiento desde el 13 de diciembre de 2014.

En esta normativa, las declaraciones nutricionales como "fuente de vitamina", en el caso concreto de las bebidas, como se menciona anteriormente, la cantidad correspondiente es 7,5 % de la VRN.

Tabla 9.32: Grupo 3B: Productos que declaran propiedades saludables

 		
N12	N13	
 	  	
B17	B18	B19

9.5. CONCLUSIONES PARCIALES

- El estudio de mercado proporcionó información sobre la gran diversidad de productos que se pueden encontrar actualmente en los lineales de zumos. En este sentido han tenido gran importancia el crecimiento de los productos refrigerados, principalmente zumos, y la variedad de sabores existente en el mercado, gracias a la significativa contribución de los productos mixtos, así como la gran oferta presentada por las marcas del distribuidor.
- Los néctares que incluyeron cítricos en su composición presentaron valores de vitamina C superiores a 80 mg ácido ascórbico/día, es decir, a la cantidad diaria recomendada para esta vitamina.
- El método Folin refleja la presencia de sustancias como el ácido ascórbico, que junto a los polifenoles, contribuyen a la capacidad antioxidante total de las bebidas a base de fruta, y cuyo valor asciende, en términos generales, conforme lo hace la cantidad de zumo en las mismas.
- El menor valor de °Brix correspondió a un néctar que indicaba en su etiqueta la sustitución de azúcar por edulcorantes. Concretamente, el valor obtenido correspondió a la mitad de los encontrados en los otros dos néctares analizados.
- En las bebidas elaboradas con zumos de frutos rojos, como la uva y la acerola, el ácido orgánico mayoritario fue el ácido quínico, mientras que el ácido cítrico destacó en el resto de bebidas analizadas, y especialmente, en aquellas compuestas mayoritariamente por zumo de naranja o piña.
- El contenido de polifenoles totales, estimado por el método Fast Blue BB, es dos veces mayor en los zumos compuestos mayoritariamente por frutos rojos que en los néctares elaborados con estos mismos frutos, y prácticamente cuadriplica el contenido en el néctar de naranja y en el zumo de naranja y mango.

- En los cuatro productos que contenían frutas rojas en una mayor proporción, los valores medios de antocianinas monoméricas oscilaron entre 99,05 y 7,38 mg cianidin-3-glucósido/100 ml, encontrados en un zumo compuesto por uva, granada y grosella negra, y en otro de frutos rojos y acerola, respectivamente. El elevado porcentaje de color polimérico obtenido en este último apunta a la degradación térmica de las antocianinas durante su tratamiento de estabilización, ya que se trata de un producto que puede conservarse a temperatura ambiente.
- El método Fast Blue BB, empleado para la determinación del contenido en polifenoles totales, correlaciona bien con el CUPRAC (0,936 con una $p < 0,01$), y también con un método de transferencia de átomo de hidrógeno, como el ORAC (0,912 $p < 0,01$). Entre los métodos de capacidad antioxidante, la mejor correlación fue entre Folin/FRAP (0,906 $p < 0,01$), seguida por TEAC/CUPRAC (0,895 $p < 0,01$).
- Entre los néctares, la mayor capacidad antioxidante correspondió al que mayor contenido de polifenoles totales presentaba y además contenía vitamina C. El menor índice de potencial antioxidante se halló, igual que ocurrió en los zumos, en el néctar cuyo componente mayoritario era el zumo de naranja.
- El análisis de componentes principales muestra que los parámetros Fast Blue BB, ácido tartárico, ácido quínico, así como la capacidad antioxidante determinada por CUPRAC y TEAC, son los que tienen mayor influencia en la caracterización de las muestras.

- En el muestreo definitivo, todas las bebidas, excepto dos, presentaban declaración nutricional en su etiquetado, alegando contenido en antioxidantes, ya sea mediante la leyenda “fuente de” o nombrándolos en la etiqueta del producto. Aunque no se trate de una declaración de propiedades saludables en sí misma, podría dar a entender una declaración sobre polifenoles, que no está permitida.
- En los zumos y néctares analizados, el mayor contenido en polifenoles totales y la mayor capacidad antioxidante, determinada por el índice de potencial antioxidante compuesto, se obtuvieron en el zumo de uva roja, granada y grosella negra (que no presentaba ninguna alegación) y en el zumo de acerola y frutos rojos, que mostraba en su etiquetado la leyenda “fuente natural de antioxidantes y vitamina C”. El menor índice de potencial antioxidante correspondió al néctar que presentaba en su etiqueta la declaración “contenido en polifenoles”.
- En referencia a las declaraciones nutricionales presentadas, el néctar que mayor contenido de vitamina C declara en su etiquetado, con 60 mg ácido ascórbico/100 ml, fue el que mayor contenido de ácido ascórbico presentó, $69,10 \pm 2,96$ mg ácido ascórbico/100 ml.

Conclusiones

10. CONCLUSIONES

Metodología

1. El denominado Fast Blue BB resulta un método eficaz, sencillo y económico para la estimación de polifenoles totales y presenta una buena correlación con los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante empleados, especialmente con el CUPRAC, tanto en muestras de café soluble como de bebidas a base de fruta, y con el ORAC en estas últimas.
2. La capacidad antioxidante evaluada mediante el método que utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu, habitualmente utilizado para medir el contenido de polifenoles totales, presenta una buena correlación estadística con otros métodos de análisis de capacidad antioxidante y resulta conveniente para un análisis inicial de las muestras.
3. El Índice de Potencial Antioxidante compuesto es un parámetro adecuado para la comparación de la capacidad antioxidante, de más de una muestra, obtenida por diferentes métodos de análisis.

Compuestos Bioactivos, actividad antioxidante y bioaccesibilidad en el Café

4. La presencia de un 35 % de café verde en el café soluble enriquece la bebida preparada con él en polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, comparada con la obtenida a partir de los demás cafés analizados. Sin embargo, la mezcla achicoria-café soluble implica una disminución de todos los compuestos bioactivos y de la capacidad antioxidante con respecto a los cafés solubles que no contienen achicoria.
5. Los ácidos orgánicos mayoritarios en todos los cafés analizados, excepto en la mezcla café-achicoria, fueron el ácido acético, el piroglutámico y el quínico. En la mezcla del café y achicoria destacó el ácido succínico.
6. El ensayo de bioaccesibilidad proporciona información acerca de los efectos potenciales de los compuestos liberados tras la digestión y diálisis. Respecto a la capacidad antioxidante la bioaccesibilidad media se situó entre el 20 y el 36%, correspondiendo el valor máximo al café soluble que contenía café verde.

7. Especialmente elevada resultó para el ácido quínico y el ácido acético. Dado que el café soluble es un producto con un consumo muy estable resulta de interés la elevada bioaccesibilidad de los ácidos quínico (96%) y piroglutámico (62%) debido a las propiedades como inductor antioxidante *in vivo* del primero y a las propiedades cognitivas asociadas al segundo.
8. La muestra de café verde-tostado que presentaba declaraciones sobre su contenido en polifenoles, presentó el mayor contenido en polifenoles totales, pero sin diferencias estadísticamente significativas con un café regular, y un contenido en familias polifenólicas superior al resto de los cafés analizados.

Compuestos bioactivos y evaluación de la capacidad antioxidante en bebidas a base de fruta

9. El crecimiento de los productos refrigerados, principalmente zumos, y la variedad de sabores existente en el mercado, gracias a la significativa contribución de los productos mixtos, ha provocado la presencia de una gran diversidad de bebidas a base de fruta en el mercado actual.
10. La evaluación del contenido en vitamina C en zumos, néctares y bebidas refrescantes a base de fruta, hace suponer que en la mayoría de ellas se produjo una adición, incluso por encima de la CDR.
11. El empleo del método Folin para la evaluación de la capacidad antioxidante de las bebidas a base de fruta permite apreciar que la de los zumos es mayor que la de los néctares y ésta, a su vez, que la de las bebidas.
12. El ácido mayoritario en cinco de las seis muestras analizadas fue el ácido cítrico. En el zumo de acerola y frutos rojos, sin embargo, predominó el ácido quínico.
13. Los zumos y néctares compuestos mayoritariamente por frutos rojos tienen mayor contenido de polifenoles totales, según el método Fast BB Blue, y mayor capacidad antioxidante, determinada por el índice de potencial antioxidante, que aquellos que presentan mayoritariamente frutos cítricos. En estos últimos se encuentran contenidos de ácidos hidroxicinámicos superiores a los encontrados en los primeros.

14. El análisis de componentes principales muestra cómo, en los zumos y néctares, los parámetros Fast Blue BB, ácido tartárico, ácido quínico, así como la capacidad antioxidante determinada por CUPRAC y TEAC, son los que tienen mayor influencia en la caracterización de las muestras.
15. El máximo valor de ácido ascórbico se obtuvo en un néctar de naranja, frambuesa, zanahoria, grosella negra y acerola que presentaba alegaciones sobre su contenido en vitamina C.

En resumen, hay que destacar la contribución de ambas bebidas a la ingesta de polifenoles. Así, 200 ml de café soluble y de zumo de frutos rojos, aportan alrededor de 300 y 600 mg de ácido gálico, respectivamente. Además estos zumos comerciales contribuyen a la ingesta de vitamina C con un 30% de la CDR por vaso.

El estudio del etiquetado de los zumos mostró deficiencias relativas al cumplimiento del Reglamento 1924 de 2006, y no se encontraron diferencias significativas en los contenidos de los compuestos bioactivos alegados en la etiqueta de un zumo, "fuente de antioxidantes y vitamina C", respecto a los encontrados en los que no presentaban alegaciones.

Referencias Bibliográficas

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11.1. BIBLIOGRAFÍA CIENTÍFICA

- Aarabi, A., Barzegar, M., y Azizi, M. H. (2008). Effect of cultivar and cold storage of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices on organic acid composition. *ASEAN Food Journal*, 15(1), 45-55.
- AESAN, (2011). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Proyecto ENIDE Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española. Recuperado de: http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/evaluacion_riesgos/subseccion/enide.Shtml
- AIJN, European Fruit Juice Association (2010). Fruit liquid 2010. Market Report. Recuperado de: <http://sec.aijn.org/pages/main/file.handler?f=AIJNMarketReport2010.pdf>.
- AIJN, European Fruit Juice Association (2012). Fruit liquid 2012. Market Report. Recuperado de: <http://www.aijn.org/pages/main/file.handler?f=AIJNMarketReport2012.pdf>
- Alarcón, E., Campos, A. M., Edwards, A. M., Lissi, E., y López-Alarcón, C. (2008). Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chemistry*, 107(3), 1114-1119.
- Álvarez, J., Pastoriza, S., Alonso-Olalla, R., Delgado-Andrade, C., y Rufián-Henares, J. A. (2014). Nutritional and physicochemical characteristic of commercial Spanish citrus juices. *Food Chemistry*, 164, 396-405.
- Andersen, Ø. M. y Jordheim, M. (2006). The anthocyanins. En Ø. M. Andersen, y K. R. Markham, (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* (pp. 471-553). Boca Raton: Taylor and Francis.
- Andrés-Lacueva, C., Medina-Remon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., y Lamuela-Raventos, R. M. (2010). Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. En: L. A. De la Rosa, E. Alvarez-Parrilla, G. A. González-Aguilar (Eds.), *Fruit and Vegetable: Phytochemicals, Chemistry, nutritional value and stability* (pp. 53- 88). Ames: Wiley-Blackwell.

- ANFABRA. (2010). Las bebidas refrescantes en España. Informe socioeconómico. Recuperado de: <http://www.refrescantes.Es/informe-socioeconomico/>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., y Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., y Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyurek, M., y Celik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413-419.
- Asghar, M. N., Khan, I. U., Arshad, M. N., y Sherin, L. (2007). Evaluation of antioxidant activity using an improved DMPD radical cation decolorization assay. *Acta Chimica Slovenica*, 54(2), 295.
- Avery, S. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal*, 434, 201-210.
- Ball, G. F. (2005). *Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability* (Vol. 156). Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., Tedeschi, P., Brandolini, V., y Frígola, A. (2013). A Comparative Study of the Analysis of Antioxidant Activities of Liquid Foods Employing Spectrophotometric, Fluorometric, and Chemiluminescent Methods. *Food Analytical Methods*, 6(1), 317-327.
- Barros, L., Ferreira, M. J., Queiros, B., Ferreira, I. C., y Baptista, P. (2007). Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103(2), 413-419.
- Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M., y Ferreira, I. C. (2008). Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3856-3862.
- Benelam, B., y Wyness, L. (2010). Hydration and health: a review. *Nutrition Bulletin*, 35(1), 3-25.

- Benito, P., y Miller, D. (1998). Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutrition Research*, 18(3), 581-603.
- Benzie, I. F., y Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72(3), 1157-1165.
- Berker, K. I., Güçlü, K., Demirata, B., y Apak, R. (2010). A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*, 2(11), 1770-1778.
- Besco, E., Braccioli, E., Vertuani, S., Ziosi, P., Brazzo, F., Bruni, R., y Manfredini, S. (2007). The use of photochemiluminescence for the measurement of the integral antioxidant capacity of baobab products. *Food Chemistry*, 102(4), 1352-1356.
- Boffetta, P., Couto, E., Wichmann, J., Ferrari, P., Trichopoulos, D., Bueno-de-Mesquita, H, y Norat, T. (2010). Fruit and vegetable intake and overall cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Journal of the National Cancer Institute*, 102(8), 529-537.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., y Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH•free Radical Method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- Bonoli, M. Verardo, V. Marconi, E. Caboni, M. F. (2004). Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52(16), 5195-5200.
- Borges, G., Mullen, W., y Crozier, A. (2010). Comparison of the polyphenolic composition and antioxidant activity of European commercial fruit juices. *Food & Function*, 1(1), 73-83.

- Bouayed, J., y Bohn, T. Dietary derived antioxidants: implications on health. (2012). En: J. Bouayed y T. Bohn (Eds.), *Nutrition, Well-Being and Health*, ISBN: 978-953-51-0125-3, InTech, DOI: 10.5772/25337. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/dietary-derived-antioxidants-implication-on-health>
- Boyer, J., y Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(1), 5, 1-15.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Bravo, L., Sarriá, B., Gómez Juaristi, M., Martínez López, S., y Mateos, R. (2010). Posibles beneficios del consumo de café verde en salud. *Alimentación Nutrición y Salud*, 17(3), 79-87.
- Brenna, O. V., Ceppi, E. L., y Giovanelli, G. (2009). Antioxidant capacity of some caramel-containing soft drinks. *Food Chemistry*, 115(1), 119-123.
- Brezová, V., Šlebodová, A., y Staško, A. (2009). Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*, 114(3), 859-868.
- Brenneisen, P., Steinbrenner, H., y Sies, H. (2005). Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4), 256-267
- Briandet, R., Kemsley, E. K., y Wilson, R. H. (1996). Discrimination of Arabica and Robusta in instant coffee by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 170-174.
- Brownmiller, C., Howard, L. R., y Prior, R. L. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, 73(5), H72-H79.
- Buettner, G. R. (1987). Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radical Biology and Medicine*, 3(4), 259-303.
- Buettner, G. R., y Mason, R. P. (1990). Spin-trapping methods for detecting superoxide and hydroxyl free radicals *in vitro* and *in vivo*. *Methods in Enzymology*, 186, 127-133.

- Butt, M. S., y Sultan, M. T. (2011). Coffee and its consumption: benefits and risks. *Critical Reviews in Food Science and nutrition*, 51(4), 363-373.
- Cámara, M., Diez, C., y Torija, E. (1995). Chemical characterization of pineapple juices and nectars. Principal components analysis. *Food Chemistry*, 54(1), 93-100.
- Cámara M., Pérez M. L., López R., Martí N., Saura D., y Micol V. (2011). Nutrición y salud. En: Asociación Española de Fabricantes de Zumos (Eds.). *El libro del zumo* (pp. 117-140). Madrid: ASOZUMOS.
- Campos, C., Guzmán, R., López-Fernández, E., y Casado, Á. (2009). Evaluation of the copper (II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: the CUPRAC–BCS assay. *Analytical Biochemistry*, 392(1), 37-44.
- Cano-Marquina, A., Tarín, J. J., y Cano, A. (2013). The impact of coffee on health. *Maturitas*, 75(1), 7-21.
- Carocho, M., y Ferreira, I. C. (2012). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51C, 15–25.
- Catalá, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 157(1), 1-11.
- Chen, H., Zuo, Y., y Deng, Y. (2001). Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 913(1), 387-395.
- Chopra, S., Hoshino, A., Boddu, J. A., y Iida, S (2006). Flavonoid pigments as tools in molecular genetics. En E. Grotewold. (Ed.), *The science of flavonoids* (pp. 147-173). Springer: New York.
- Chung, H. Y., Choi, H. R., Park, H. J., Choi, J. S., y Choi, W. C. (2001). Peroxynitrite scavenging and cytoprotective activity of 2, 3, 6-tribromo-4, 5-dihydroxybenzyl methyl ether from the marine alga *Symphyclocladia latiuscula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3614-3621.

- Cilla, A. (2010). Actividad antioxidante y biodisponibilidad mineral de zumos de frutas adicionados de minerales y/o leche. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Číž, M., Čížová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., y Lojek, A. (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21(4), 518-523.
- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362-372.
- Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., y Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2900-2911.
- Costa, A. S. G., Nunes, M. A., Almeida, I. M. C., Carvalho, M. R., Barroso, M. F., Alves, R. C., y Oliveira, M. B. P. P. (2012). Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 49(2), 324-328.
- Crow, J. P. (1997). Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric oxide*, 1(2), 145-157.
- Crozier, A., Del Rio, D., y Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446-467.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., y Clifford, M. N. (2006a). Phenols, polyphenols and tannins: an overview. En A. Crozier, M. N. Clifford, y H. Ashihara, (Eds.), *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet* (pp. 1-24). Oxford: Blackwell Publishing.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., y Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*, 26(8), 1001-1043.
- Crozier, A., Yokota, T., Jaganath, I. B., Marks, S. C., Saltmarsh, M., y Clifford, M. N. (2006b). Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant based dietary components. En A. Crozier, M. N. Clifford, y H. Ashihara, (Eds.), *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet* (pp. 208-302). Oxford: Blackwell Publishing.

- Cunha, S. C., Fernandes, J. O., y Ferreira, I. M. (2002). HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars. *European Food Research and Technology*, 214(1), 67-71.
- Da Cruz, G. (2003). Use of bathocuproine for the evaluation of the antioxidant power in liquids and solutions U. S. Patent No. 6,613,577. Washington, DC: U. S. Patent and Trademark Office.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., y Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 48-54.
- de Quirós, A., Fernández-Arias, M., y López-Hernández, J. (2009). A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. *Food Chemistry*, 116(2), 509-512.
- Debry, G. (1994). *Coffee and health*. London: Libbey Eurotext.
- Decker, E. A., Akoh, C. C., y Min, D. B. (2002). Antioxidant mechanisms. En C. C. Akoh y D. B. Min, (Eds.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, Second Edition, Revised and Expanded (pp. 517-542). New York: Marcel Dekker, INC.
- Del Rio, D., Borges, G., y Crozier, A. (2010a). Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 104(3), S67-S90.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., y Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818-1892.
- Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L., y Crozier, A. (2010b). Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients*, 2(8), 820-833.
- Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C., y Scalbert, A. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *The Journal of Nutrition*, 130(11), 2733-2738.
- Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., y Viña-Ribes, J. (1998). Functional Food Science and defence against reactive oxidative species. *The British Journal of Nutrition*, 80, S77.
-

- Dixon, R. A., Xie, D. Y., y Sharma, S. B. (2005). Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research?. *New Phytologist*, 165(1), 9-28.
- Donovan, J. L., Manach, C., Faulks, R. M., y Kroon, P. A. (2006). Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites. En A. Crozier, M. N. Clifford, y H. Ashihara (Eds.), *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet* (pp. 303-351). Oxford: Blackwell Publishing.
- Donovan, J. L., Meyer, A. S., y Waterhouse, A. L. (1998). Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1247-1252.
- Dórea, J. G., y da Costa, T. H. M. (2005). Is coffee a functional food?. *British Journal of Nutrition*, 93(06), 773-782.
- Du, G., Li, M., Ma, F., y Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry*, 113(2), 557-562.
- Duarte, I. F., Goodfellow, B. J., Gil, A. M., y Delgadillo, I. (2005). Characterization of Mango Juice by High-Resolution NMR, Hyphenated NMR, and Diffusion-Ordered Spectroscopy. *Spectroscopy letters*, 38(3), 319-342.
- Dubost, N. J., Ou, B., y Beelman, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105(2), 727-735.
- Durazzo, A., Zaccaria, M., Polito, A., Maiani, G., y Carcea, M. (2013). Lignan Content in Cereals, Buckwheat and Derived Foods. *Foods*, 2(1), 53-63.
- Duthie, G., y Crozier, A. (2003). Beverages. En *Plants: Diet and Health: The Report of a British Nutrition Foundation Task Force*, 147-182.
- Ehling, S., y Cole, S. (2011). Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Enhanced Tool for Authenticity Testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2229-2234.
- ECF, European Coffee Federation. (2006). Coffee facts and figures. Recuperado de: <http://www.Ecf-coffee.org/publications>

- ECF. (2014). European Coffee Report 2013/14. European chapter and key national data. Recuperado de: http://www.ecf-coffee.org/images/European_Coffee_Report_2013-14.pdf
- Eisele T. A., y Drake S. R. (2005). The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18 (2-3), pp. 213-221.
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *International journal of Food Science and technology*, 44(12), 2512-2518.
- EHI, European Institute Hydration (2014). Niveles de hidratación. Recuperado de: http://www.Europeanhydrationinstitute.org/es/hydration_levels.html
- Fan-Chiang, H. J., y Wrolstad, R. E. (2010). Sugar and nonvolatile acid composition of blackberries. *Journal of AOAC International*, 93(3), 956-965.
- Fang, Y. Z., Yang, S., y Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- Farah, A. (2012). Coffee Constituents. En Y. F., Chu.(Ed.). *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention* (pp.21-58). Oxford: John Wiley y Sons.
- Fraga, C. G., y Oteiza, P. I. (2011). Dietary flavonoids: role of (–)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(4), 813-823.
- Fedorova, G. F., Trofimov, A. V., Vasil'ev, R. F., y Veprintsev, T. L. (2007). Peroxy-radical-mediated chemiluminescence: mechanistic diversity and fundamentals for antioxidant assay. *Arkivoc*, 8, 163-215.
- Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., y Fernández-López, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59(3), 345-353.
- Fernández-Ruiz. V, Gómez, A. Sánchez M. J. Corbacho. A. (2011). Comercialización y consumo, En: Asociación Española de Fabricantes de Zumos (Eds.). *El libro del zumo* (pp.141-163). Madrid: ASOZUMOS.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., y Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1035-1040.

- Fórum Café, 2012. El mercado del café en España 2011. Recuperado de: http://www.forumdelcafe.com/pdf/F-49_Cafe_Espana.pdf
- Fröhling, B., Patz, C. D., Dietrich, H., y Will, F. (2012). Anthocyanins, total phenolics and antioxidant capacities of commercial red grape juices, black currant and sour cherry nectars. *Fruit Process*, 3, 100-104.
- Galli, V., y Barbas, C. (2004). Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee. *Journal of Chromatography A*, 1032(1), 299-304.
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., y Caristi, C. (2007). Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*, 12(8), 1641-1673.
- George, S. E., Ramalakshmi, K., y Mohan Rao, L. J. (2008). A perception on health benefits of coffee. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 464-486.
- Ghiselli A., Serafini M., Natella F., y Scaccini C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29 (11), pp. 1106-1114.
- Gibson, S., Gunn, P., y Maughan, R. J. (2012). Hydration, water intake and beverage consumption habits among adults. *Nutrition Bulletin*, 37(3), 182-192.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., y Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581-4589.
- Gille, G., y Sigler, K. (1995). Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiologica*, 40(2), 131-152.
- Giner, J. (2009). El tueste del café. *Fórum Café* (37), 6-15. Recuperado de: <http://www.forumdelcafe.com/articulos-detalle.php?id=12>
- Giusti, M., y Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. En R. E. Wrolstad (Ed), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (pp. F1.2.1-F1.2.13). New York: John Wiley y Sons.
- Gomes, A., Fernandes, E., y Lima, J. L. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2), 45-80.

- Gómez-Ruiz, J. Á., Leake, D. S., y Ames, J. M. (2007). *In vitro* antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6962-6969.
- González-Gross, M., Pedrero Chamizo, R., y Valtueña Santamaría, J. (2013). Agua. Hidratación. En G. Varela Moreiras (coord.), *Libro Blanco de la Nutrición en España* (pp. 165-178). Madrid: FEN-AECOSAN. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Granato, D., de Araújo Calado, V. M., y Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in Food Science and technology. *Food Research International*, 55, 137-149.
- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., y Prior, R. L. (2004). Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of nutrition*, 134(3), 613-617.
- Gu, L. (2012). Analysis methods of proanthocyanidins. En Z. CSU y LORD Howard (Eds.) *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals* (pp. 247-271). Chichester: John Wiley & Sons.
- Guillén Sans, R. (2001). Agua y bebidas no alcohólicas. En Sociedad Española Nutrición Comunitaria (Ed.), *Guías Alimentarias para la Población Española* (pp. 147-158). Madrid: MIMIC SA.
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391.
- Guttering, J. M. C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819-1828.
- Hager, T. J., Howard, L. R., y Prior, R. L. (2008a). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 689-695.
- Hager, A., Howard, L. R., Prior, R. L., y Brownmiller, C. (2008b). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. *Journal of Food Science*, 73(6), H134-H140.
- Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *The FASEB Journal*, 1(5), 358-364.
-

- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1341-1348.
- Halliwell, B. (2002). Food-derived antioxidants: how to evaluate their importance in food and in vivo. En E. Cadenas, y L Packer (Eds.), *Handbook of Antioxidants*, (pp. 1-45). New York: Marcel Dekker.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition reviews*, 70(5), 257-265.
- Halliwell, B. y Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715S-724S.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), 1.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radicals, other reactive species and disease. En B. Halliwell y J. M. C Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed.; (pp 617-783). Oxford: Oxford University Press.
- Hanlon, M. C., y Seybert, D. W. (1997). The pH dependence of lipid peroxidation using water-soluble azo initiators. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(5), 712-719.
- Hellström, J. K., Törönen, A. R., y Mattila, P. H. (2009). Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7899-7906.
- Hernández-Ledesma B., Dávalos A., Bartolomé B., y Amigo L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Kromhout, D., Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L., y Katan, M. B. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342(8878), 1007-1011.
- Hidalgo Jerez, M. (2013). Antocianos: Metabolismo y Actividad Biológica (Doctoral dissertation). Universidad Complutense de Madrid.

- Huang, D., Ou, B., y Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huang, Y., Rasco, B. A., y Cavinato, A. G. (2009). Fruit Juices. En D. Sun (Ed.), *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, (pp. 355-375). Londres: Academic Press.
- ICEX. (2012). El mercado de los zumos en Francia. Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en París. Recuperado de: <http://www.icex.es/icex/es/navegacion-principal/todos-nuestros-servicios/informacion-de-mercados/paises/navegacion-principal/el-mercado/estudios-informes/4619044.html?idPais=FR>
- ICO, International Organization Coffee. (2015a). Exportaciones: Año de cosecha, 2013/2014. Datos históricos. Recuperado de http://www.ico.org/es/new_historical_c.asp
- ICO. (2015b). Importaciones: Año civil, 2013. Datos históricos. Recuperado de: http://www.ico.org/es/new_historical_c.asp
- ICO. (2015c). Producción total. Año de cosecha, 2013/2014. Datos históricos. Recuperado de: http://www.ico.org/es/new_historical_c.asp
- IFU, International Federation of Fruit Juice Producers. (2012). Fruit Juice Nutrition and Health Scientific Review. Recuperado de: <http://www.ifu-fruitjuice.com/>
- Ignat, I., Volf, I., y Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Jaganath, I. B., y Crozier, A (2010). Dietary flavonoids and phenolic compounds. En C. G. Fraga, (Ed.), *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology* (pp. 1-49). Hoboken: John Wiley & Sons.
- Jakobek, L., Šeruga, M., Jovanović, I. N., y Medvidović-Kosanović, M. (2007). Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103(8), 369-378.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., y Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry*, 73(3), 285-290.
- Kang, N. J., Lee, K. W., Kim, B. H., Bode, A. M., Lee, H. J., Heo, Y. S., y Dong, Z. (2011). Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. *Carcinogenesis*, 32(6), 921-928.
-

- Karadag, A., Ozcelik, B., y Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60.
- Karaman, Ş., Tütem, E., Başkan, K. S., y Apak, R. (2010). Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. *Food Chemistry*, 120(4), 1201-1209.
- Khan, N., Wilmot, C. M., Rosen, G. M., Demidenko, E., Sun, J., Joseph, J., y Swartz, H. M. (2003). Spin traps: in vitro toxicity and stability of radical adducts. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(11), 1473-1481.
- Knasmüller, S., Nersesyan, A., Mišík, M., Gerner, C., Mikulits, W., Ehrlich, V., y Wagner, K. H. (2008). Use of conventional and-omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical overview. *British Journal of Nutrition*, 99(E-S1), ES3-ES52.
- Kelebek H , Selli S, Canbas A, Cabaroglu T .(2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions y antioxidant capacity of orange juice y orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187-192.
- Kohen, R., y Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
- Kyle, J. A. M. y Duthie, G. G. (2006). Flavonoids in foods. En O. M., Andersen, y K. R. Markham, (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*, (pp. 219-262). Boca Raton: CRC Press.
- Lafay, S., y Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 301-311.
- Laguerre, M., Lecomte, J., y Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244-282.
- Landete, J. M. (2013). Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 706-721.
- Latimer, G. W. (2012). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International* (19th ed). Gaithersburg: AOAC International.

- Lee, J., Koo, N., y Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21-33.
- Legua, P., Melgarejo, P., Martínez, J. J., Martínez, R., y Hernández, F. (2012). Evaluation of Spanish pomegranate juices: Organic acids, sugars, and anthocyanins. *International Journal of Food Properties*, 15(3), 481-494.
- Leopold, L., Horst, D., y Socaciu, C. (2006). HPLC Fingerprint of organic acids in fruit juices. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 62, 288-292.
- Lester, G. E., Lewers, K. S., Medina, M. B., y Saftner, R. A. (2012). Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 102-107.
- Li, L., Chen, C. Y. O., Chun, H. K., Cho, S. M., Park, K. M., Lee-Kim, Y. C., y Yeum, K. J. (2009). A fluorometric assay to determine antioxidant activity of both hydrophilic and lipophilic components in plant foods. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(3), 219-226.
- Lichtenthäler, R., y Marx, F. (2005). Total oxidant scavenging capacities of common European fruit and vegetable juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 103-110.
- Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C., Del Castillo M. D. (1995). Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, 18 (2), pp. 153-158.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 517S-520S.
- López-Alarcón, C., y Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
- Ludwig, I. A., Clifford, M. N., Lean, M. E., Ashihara, H., y Crozier, A. (2014). Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food & function*, 5(8), 1695-1717.

- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., y Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., y Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
- Maieves, H. A., López-Froilán, R., Morales, P., Pérez-Rodríguez, M. L., Ribani, R. H., Cámara, M., y Sánchez-Mata, M. C. (2015). Antioxidant phytochemicals of *Hovenia dulcis* Thunb. peduncles in different maturity stages. *Journal of Functional Foods*. doi:10.1016/j.jff.2015.01.044
- MAGRAMA (2014). Panel de Consumo: Bases de datos panel de consumo en hogares. Recuperado de:
<http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/base-de-datos-de-consumo-en-hogares/consulta.asp>
- MAGRAMA (2015). Panel de Consumo: Bases de datos panel de consumo en hogares. Nueva base de datos 2013 y 2014. Recuperado de: <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/base-de-datos-de-consumo-en-hogares/consulta.asp>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., y Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Martí, N., Mena, P., Cánovas, J. A., Micol, V., y Saura, D. (2009). Vitamin C and the role of citrus juices as functional food. *Natural Product Communications*, 4(5), 677-700.
- Martínez J. R, Villarino A, e Iglesias. C. (2007). Necesidades generales de ingesta de agua en la población. En J. A. Pinto y J. R. Martínez (Cords.), Consejería de Sanidad (Comunidad de Madrid). (Ed.), *El agua en la alimentación* (pp. 65-78). Colección Nutrición y Salud número 4. Madrid: Dirección General de Salud Pública y Alimentación.
- Martínez-González, M. A., y Estruch, R. (2004). Mediterranean diet, antioxidants and cancer: the need for randomized trials. *European Journal of Cancer Prevention*, 13(4), 327-335.

- Marx, F., Maia, J. G. S., y Rodrigues, R. B. (2005). The Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC) Assay and Its Application to European and Under-utilized Brazilian Fruits. In *Lebensmittelwissenschaftliches Seminar der DAAD-Alumni, Fortaleza/Brasilien* (Vol. 11, pp. 21-23).
- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2007). Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chemistry*, 102(1), 104-112.
- Mayne, S. T. (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *The Journal of Nutrition*, 133(3), 933S-940S.
- Medina, M. B. (2011a). Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of Functional Foods*, 3(2), 79-87.
- Medina, M. B. (2011b). Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1565-1571.
- Miller, D. D., Schricker, B. R., Rasmussen, R. R., y Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2248-2256.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., y Veberic, R. (2012). Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science*, 77(10), C1064-C1070.
- Mezadri, T., Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., García-Parrilla, M. C., y Troncoso, A. M. (2008). Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 282-290.
- Moon, J. K., y Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655-1666.
- Morales, P., Carvalho, A. M., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Molina, M., y Ferreira, I. C. (2012). Tocopherol composition and antioxidant activity of Spanish wild vegetables. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(5), 851-863.

- Morales, P., Ferreira, I. C., Carvalho, A. M., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., y Tardío, J. (2013). Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Gimenez-Martinez, R., Navarro-Alarcon, M., y Rufián-Henares, J. A. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38, 19-26.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., y Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 661-672.
- Mullen, W., Borges, G., Lean, M. E., Roberts, S. A., y Crozier, A. (2010). Identification of metabolites in human plasma and urine after consumption of a polyphenol-rich juice drink. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2586-2595.
- Mullen, W., Marks, S. C., y Crozier, A. (2007). Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3148-3157.
- Mullen, W., Nemzer, B., Ou, B., Stalmach, A., Hunter, J., Clifford, M. N., y Combet, E. (2011). The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3754-3762.
- Naguib, Y. M. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(4), 1150-1154.
- Navia Lombán, B., y Perea Sánchez J. M. (2007). Fitoquímicos de origen vegetal en la prevención de enfermedades degenerativas En R. M. Ortega, A. M. Requejo, y M. G. Martínez, (Eds.), *Nutrición y alimentación en promoción de la salud*. (pp. 105-118). Cuenca: Consejería de Sanidad de Castilla la Mancha.
- Ndhlala, A. R., Moyo, M., y Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? . *Molecules*, 15(10), 6905-6930.
- Netzel, M., Strass, G., Kaul, C., Bitsch, I., Dietrich, H., y Bitsch, R. (2002). *In vivo* antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food Research International*, 35(2), 213-216.

- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 503-515.
- Nogueira, M., y Trugo, L. C. (2003). Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 23(2), 296-9.
- Nour, V., Trandafir, I., y Ionica, M. E. (2010). HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 44-48.
- NUTTAB: Food Standards Australia New Zealand.(2010). Recuperado de: <http://www.foodstandards.gov.au/science/monitoringnutrients/nutrientables/nuttab/Pages/default.aspx>.
- Oliveira, M., Casal, S., Morais, S., Alves, C., Dias, F., Ramos, S., y Oliveira, M. B. P. (2012). Intra-and interspecific mineral composition variability of commercial instant coffees and coffee substitutes: Contribution to mineral intake. *Food Chemistry*, 130(3), 702-709.
- OMS. (2003). Nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe de una consulta mixta de expertos de la OMS/FAO. Ginebra: OMS.
- OMS. (2014). Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles. Ginebra: OMS.
- O'Keefe, J. H., Bhatti, S. K., Patil, H. R., DiNicolantonio, J. J., Lucan, S. C., y Lavie, C. J. (2013). Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(12), 1043-1051.
- Ordoudi, S. A., y Tsimidou, M. Z. (2006). Crocin Bleaching Assay Step by Step: Observations and Suggestions for an Alternative Validated Protocol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1663-1671.
- Ou, B., Bosak, K. N., Brickner, P. R., Iezzoni, D. G., y Seymour, E. M. (2012). Processed Tart Cherry Products—Comparative Phytochemical Content, *in vitro* Antioxidant Capacity and *in vitro* Anti-inflammatory Activity. *Journal of Food Science*, 77(5), H105-H112.

- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., y Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R. L., y Huang, D. (2002). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2772-2777.
- Padilla-Zakour, O. I., Sullivan, E. K., y Worobo, R. W. (2012). Juices and Functional Drinks. En Y. Zhao, (Ed.), *Specialty Foods: Processing Technology, Quality, and Safety*, (229.). Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis group.
- Papetti, A., Mascherpa, D., Carazzone, C., Stauder, M., Spratt, D. A., Wilson, M., y Gazzani, G. (2013). Identification of organic acids in *Cichorium intybus* inhibiting virulence-related properties of oral pathogenic bacteria. *Food Chemistry*, 138(2), 1706-1712.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., y Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812-2819.
- Pernice, R., Borriello, G., Ferracane, R., Borrelli, R. C., Cennamo, F., y Ritieni, A. (2009). Bergamot: A source of natural antioxidants for functionalized fruit juices. *Food Chemistry*, 112(3), 545-550.
- Pero, R. W., y Lund, H. (2011). Quantitative Analytical Method Development for the Assessment of Bioactive Quinic Acid-type Esters and Free Quinic Acid in Dietary Supplements. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 7(2), 293-304.
- Pero, R.W., Lund, H., y Leanderson, T. (2009). Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. *Phytotherapy Research*, 23(3), 335-346.
- Phipps, S. M., Sharaf, M. H., y Butterweck, V. (2007). Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements. *Pharmacopeial Forum*, 33(4), 810-814.
- Plumey, L., Braesco, V., y Bellisle, F. (2013). *Le Livre Blanc du Jus de Fruits*. Paris: UNIJUS.
- Popkin, B. M. (2010). Patterns of beverage use across the lifecycle. *Physiology & behavior*, 100(1), 4-9.

- Popov, I. N., y Lewin, G. (1996). Photochemiluminescent detection of antiradical activity; IV: testing of lipid-soluble antioxidants. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 31(1), 1-8.
- Prior, R. L., y Cao, G. (2000). Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *Journal of AOAC International*, 83(4), 950-956.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., y Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3273-3279.
- Prior, R. L., y Wu, X. (2013). Diet Antioxidant Capacity: Relationships to Oxidative Stress and Health. *American Journal of Biomedical Sciences*, 5(2).
- Prior, R. L., Wu, X., y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Pulido, R., Bravo, L., y Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S., y Horax, R. (2004). Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5183-5186.
- Ramalakshmi, K., Kubra, I. R., y Rao, L. J. M. (2008). Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Research International*, 41(1), 96-103.
- Ramírez Moreno E. (2011). Influencia del procesado en compuestos de interés nutricional y funcional del Nopal (*Opuntia Ficus indica*). Tesis Doctoral.
- Ramírez-Moreno, E., Marqués, C. D., Sánchez-Mata, M. C., y Goñi, I. (2011). In vitro calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *LWT-Food Science and Technology*, 44(7), 1611-1615.
- Rao, A. V., y Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207-216.
-

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Regoli, F., y Winston, G. W. (1999). Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicology and applied Pharmacology*, 156(2), 96-105.
- Rein, M. J., y Heinonen, M. (2004). Stability and enhancement of berry juice color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3106-3114.
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., y da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588-602.
- Reische, D. W., Lillard, D. A., Eitenmiller, R. R., Akoh, C. C., y Min, D. B. (2002). Antioxidants. En C. C. Akoh y D. B. Min, (Eds.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, Second Edition, Revised and Expanded (pp.489-516). New York: Marcel Dekker, INC.
- Renaud, S. D., y de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
- Resa, S. (2011). Los sectores de café y té persiguen el rango de la degustación. *Distribución y consumo*, 21(120), 70-74.
- Rivera, J. A., Muñoz-Hernández, O., Rosas-Peralta, M., Aguilar-Salinas, C. A., Popkin, B. M., y Willett, W. C. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 65(3), 208-237.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martinez, P., y Martín-Belloso, O. (2013). Changes in vitamin C, phenolic and carotenoid profiles throughout an in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., y Martín-Belloso, O. (2014). In vitro bioaccessibility of health-related compounds from a blended fruit juice–soymilk beverage: Influence of the food matrix. *Journal of Functional Foods*, 7, 161-169.
- Roethenbaugh, G. (2005). Trends in beverage markets. En P. Ashurst (Ed.), *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices, Second Edition* (pp. 15-34). Oxford: Blackwell.
- Roginsky, V., y Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235-254.
- Romero, A. C., Hernández, E. G. O., Cerón, T. F., y Chávez, A. Á. (2013). The Exogenous Antioxidants. En J. A. Morales-Gonzalez, (Ed.), *Oxidative stress and chronic degenerative diseases a role for antioxidants*. ISBN: 978-953-51-1123-8, InTech, DOI: 10.5772/52490. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/the-exogenous-antioxidants>.
- Romero-Rodríguez, M. A., Oderiz, M. V., Hernández, J. L., y Lozano, J. S. (1992). Determination of vitamin C and organic acids in various fruits by HPLC. *Journal of chromatographic science*, 30(11), 433-437.
- Rovira, J. (2001). El café soluble. *Fórum Café* (7), 28-31. Recuperado de <http://www.forumdelcafe.com/articulos-detalle.php?id=28>
- Royo-Bordonada, M. A., Gorgojo, L., De Oya, M., Garcés, C., Rodríguez-Artalejo, F., Rubio, R., y Martín-Moreno, J. M. (2003). Food sources of nutrients in the diet of Spanish children: the Four Provinces Study. *British Journal of Nutrition*, 89(01), 105-114.
- Russell, W., y Duthie, G. (2011). Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70(03), 389-396.
- Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., y Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90(1), 133-139.
- Sánchez-Mata, M. C., Cabrera Loera, R. D., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Díez Marqués, C., y Tardío, J. (2012). Wild vegetables of the Mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(3), 431-443.
-

- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.
- Sánchez-Moreno, C., y Larrauri, J. A. (1998). Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. *Maine métodos used in lípido oxidación determinación*. *Food Science and Technology International*, 4(6), 391-399.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., y Cano, M. P. (2003). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 430-439.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., y Cano, M. P. (2006). Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. *Food Chemistry*, 98(4), 749-756.
- Sartorelli, D. S., Fagherazzi, G., Balkau, B., Touillaud, M. S., Boutron-Ruault, M. C., de Lauzon-Guillain, B., y Clavel-Chapelon, F. (2010). Differential effects of coffee on the risk of type 2 diabetes according to meal consumption in a French cohort of women: the E3N/EPIC cohort study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(4), 1002-1012.
- Saura-Calixto, F., y Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94(3), 442-447.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., y Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.
- Scalbert, A., y Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Huang, D., Owens, J., y Shanbrom, E. (2006). Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8604-8610.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., y Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177-187.

- Schlueter, A. K., y Johnston, C. S. (2011). Vitamin C: Overview and Update. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16(1), 49-57.
- Schwarz, K..., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., y Tijburg, L. (2001). Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, 212, 319–328.
- Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, M., y Heber, D. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1415-1422.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., y Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—a review. *Appetite*, 51(3), 456-467.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Skrede, C., y Wrolstad, R. E. (2002). 3 Flavonoids from Berries and Grapes. En J. Shi, G. Mazza y M. Le Maguer (Eds.). *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects, volume 2* (pp. 2-71). Boca Raton: CRC Press.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., y Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28(4), R41.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *Comptes Rendus Biologies*, 327(7), 649-662.
- Soto-Vaca, A., Gutiérrez, A., Losso, J. N., Xu, Z., y Finley, J. W. (2012). Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(27), 6658-6677.
- Souci, S.W., Fachmann, W., y Kraut, H. (2008). *Food Composition and Nutrition Tables*. 7th edition. Stuttgart: Medpharm.
-

- Stratil, P., Klejdus, B., y Kuban, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(3), 607-616.
- Suri, R., y Crozier, A. (2012). Free phenolic acids in human urine after drinking coffee rich in chlorogenic acids. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 40(2), 221-232.
- Szydlowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899-905.
- Tojo Sierra R., Dalmau Serra J., Alonso Franch M., Sanjurjo Crespo P., Martín Esteban M., Lambruschini Ferri N., Moreno Villares J. M., Leis Trabazo R. y Vitoria Miñana I (Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría) (2003). Consumo de zumos de frutas y de bebidas refrescantes por niños y adolescentes en España. Implicaciones para la salud de su mal uso y abuso. *Anales de Pediatría* Vol. 58, No. 6, 584-593.
- Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M. A., Covas, M. I., Corella, D., y Lamuela-Raventós, R. M. (2013). Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(10), 953-959.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- USDA, 2010. USDA National. Nutrient Database for Standard Reference, Release 18. Nutrient Data Laboratory. Recuperado de: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Vertuani, S., Bosco, E., Braccioli, E., y Manfredini, S. (2004). Water soluble antioxidant capacity of different teas. Determination by Photochemiluminescence. *Nutrafoods*, 3, 5-11.
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., y Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124(3), 863-868.

- Viljakainen, S., Visti, A., y Laakso, S. (2002). Concentrations of organic acids and soluble sugars in juices from Nordic berries. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science*, 52(2), 101-109.
- Vladimir-Knežević, S.; Blažeković, B.; Bival Štefan, M.; y Babac, M.(2012). Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health. En V. Rae, (Ed.), *Photochemical as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, ISBN: 978-953-51-0203-8, InTech, DOI: 10.5772/27843. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-as-nutraceuticals-global-approaches-to-their-role-in-nutrition-and-health/plant-polyphenols-as-antioxidants-influencing-the-human-health>
- Wanasundara, P. K. J. P. D., y Shahidi, F., (2005). Antioxidants: Science, technology and applications. En F. Shahidi, (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Volume 1, Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects, 6th Edition* (pp.431-489). Hoboken; John Wiley and Sons.
- Waring, W. S., Mishra, V., y Maxwell, S. R. (2003). Comparison of spectrophotometric and enhanced chemiluminescent assays of serum antioxidant capacity. *Clinica Chimica Acta*, 338(1), 67-71.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., y Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: the important contribution made by plasma proteins. *FEBS letters*, 187(1), 33-37.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Barclay, L. R. C., y Locke, S. J. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 924(3), 408-419.
- Wiczowski, W., y Piskula, M. K. (2004). Food flavonoids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 13(54), 101-114.
- Williamson, G. (2011). Coffee and health. En A. Crozier, H. Ashihara, y F. Tomás-Barbérán (Eds.), *Teas, Cocoa and Coffee: Plant Secondary Metabolites and Health* (pp.169-192). Oxford: Blackwell.
-

- Williamson, G., y Holst, B. (2008). Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction?. *British Journal of Nutrition*, 99(S3), S55-S58.
- Winston, G. W., Regoli, F., Dugas Jr, A. J., Fong, J. H., y Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(3), 480-493.
- Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I., y Wozniak, L. A. (2010). A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Current Medicinal Chemistry*, 17(28), 3262-3.
- Wootton-Beard, P. C., y Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44(10), 3135-3148.
- Xu, Z. (2012). Important antioxidant phytochemicals in Agricultural food products. En Z. Xu, y L. R., Howard (Eds.), *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals* (pp. 1-24). Chichester: John Wiley & Sons.
- Zambonin, L., Caliceti, C., Viecei Dalla Sega, F., Fiorentini, D., Hrelia, S., Landi, L., y Prata, C. (2012). Dietary phenolic acids act as effective antioxidants in membrane models and in cultured cells, exhibiting proapoptotic effects in leukaemia cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2012,1-12.
- Zamora-Ros, R., Serafini, M., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R. M., Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., y Andres-Lacueva, C. (2013). Mediterranean diet and non-enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: Evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(12), 1167-1174.
- Zhang, L., Huang, D., Kondo, M., Fan, E., Ji, H., Kou, Y., y Ou, B. (2009). Novel high-throughput assay for antioxidant capacity against superoxide anion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2661-2667.
- Zheng, J., Kallio, H., y Yang, B. (2009). Effects of latitude and weather conditions on sugars, fruit acids and ascorbic acid in currant (*Ribes* sp.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(12), 2011-2023.

Zheng, W., y Wang, S. Y. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 502-509.

Zollinger H. (2004). Azo dyes and pigments. En H. Zollinger (Ed.), *Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments 3rd revised edition* (pp. 165-241). Zurich: Verlag Helvetica Chimica Acta.

11.2. NORMATIVA

Directiva 90/496/CEE del Consejo, de 24 de septiembre de 1990, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios.

Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana

Directiva 2008/100/CE de la Comisión de 28 de octubre de 2008 por la que se modifica la Directiva 90/496/CEE del Consejo, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, en lo que respecta a las cantidades diarias recomendadas, los factores de conversión de la energía y las definiciones.

Directiva 2012/12/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 19 de abril de 2012 por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

Norma general del CODEX para zumos (jugos) y néctares de frutas (CODEX STAN 247-2005) por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

Real Decreto 2323/1985, de 4 de diciembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, almacenamiento, transporte y comercialización de sucedáneos de café.

Real Decreto 2362/1985, de 4 de diciembre, por el que se autoriza la comercialización de las mezclas de solubles de café con solubles de sucedáneos de café.

Real Decreto 1044/1987, de 31 de julio, por el que se regula la elaboración de zumos de uva.

Real Decreto 930/1992, de 17 julio, por el que se aprueba la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de productos.

Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

Real Decreto 1518/2007, de 16 de noviembre, por el que se establecen parámetros mínimos de calidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables.

Real Decreto 1676/2012, de 14 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad para el café.

Real Decreto 650/2011, de 9 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria en materia de bebidas refrescantes.

Real Decreto 781/2013, por el que se establecen normas relativas a los zumos de frutas.

Reglamento (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos

Reglamento (CE) No 1925/2006 del Parlamento Europeo y el Consejo de 20 de diciembre de 2006 sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos.

Reglamento (CE) No 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios.

Reglamento (CE) No 1334/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos.

Reglamento (UE) No 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.

Reglamento (UE) No 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.

Anexo

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO

Artículos en revistas científicas

Maieves, H. A., López-Froilán, R., Morales, P., Pérez-Rodríguez, M. L., Ribani, R. H., Cámara, M., & Sánchez-Mata, M. C. (2015). Antioxidant phytochemicals of *Hovenia dulcis* Thunb. peduncles in different maturity stages. *Journal of Functional Foods*. En prensa. doi:[10.1016/j.jff.2015.01.044](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.044)

Podio N. S., López-Froilán, R., Ramirez-Moreno, E., Bertrand, L., Baroni M. V., Pérez-Rodríguez M. L., Sánchez-Mata M. C., Wunderlin, D. A. (2015). Matching in vitro bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of soluble coffee by Boosted Regression Trees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Aceptado.

Capítulos de libros

Cámara M., Pérez M. L., López R., Martí N., Saura D., y Micol V. (2011). Nutrición y salud. En: Asociación Española de Fabricantes de Zumos (Eds.). *El libro del zumo* (pp. 117-140). Madrid: ASOZUMOS.

Comunicaciones a congresos

Sánchez-Mata, M. C., Maieves, H. A., López-Froilán, R., Morales, P., Pérez-Rodríguez, M. L., Ribani, R. H., y Cámara, M. (2014). Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en los pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunberg, durante su proceso de maduración. Publicado en Alfonso Pardo, M^a Luisa Suso y Luis Rivacoba (Eds.), Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Actas de Horticultura. Comunicaciones técnicas XIII Jornadas del Grupo de Horticultura: I Jornadas del Grupo de Alimentación y Salud. Logroño 3 y 4 de junio de 2014 (pp. 35-40). Logroño: Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, 2014.

- López Froilán, R., Cámara M., Pérez Rodríguez, M. L. (2014) Hábitos de consumo de bebidas en la población española. IX Congreso Internacional nutrición, alimentación y dietética. XVIII Jornadas Nacionales de Nutrición Práctica. Madrid 19 al 21 de marzo de 2014. Comunicación de tipo póster. Publicado: Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria. 34(supl. 1)118.
- Podio N.S., Ramírez E. Lopez R., Baroni M.V., Sánchez-Mata M.C., Pérez-Rodríguez M.L., Wunderlin D.A. (2012). Propiedad antioxidante de distintos tipos de café soluble pre y post-digestión gastro-intestinal *in vitro*. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina, 14 a 16 de Noviembre de 2012. Comunicación oral. Publicado: Libro de trabajos completos, Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba, 193-198.
- López-Froilán Rebeca, Pérez-Rodríguez M^a Luisa. Determination of antioxidant capacities in flavored waters. (2011). VII Congreso Internacional nutrición, alimentación y dietética. XV Jornadas Nacionales de Nutrición Práctica. Madrid, 30, 31 de Marzo, 1 de Abril de 2011. Comunicación de tipo póster. Publicado: Nutrición Clínica Y Dietética Hospitalaria. 31 (supl. 1) 39.

